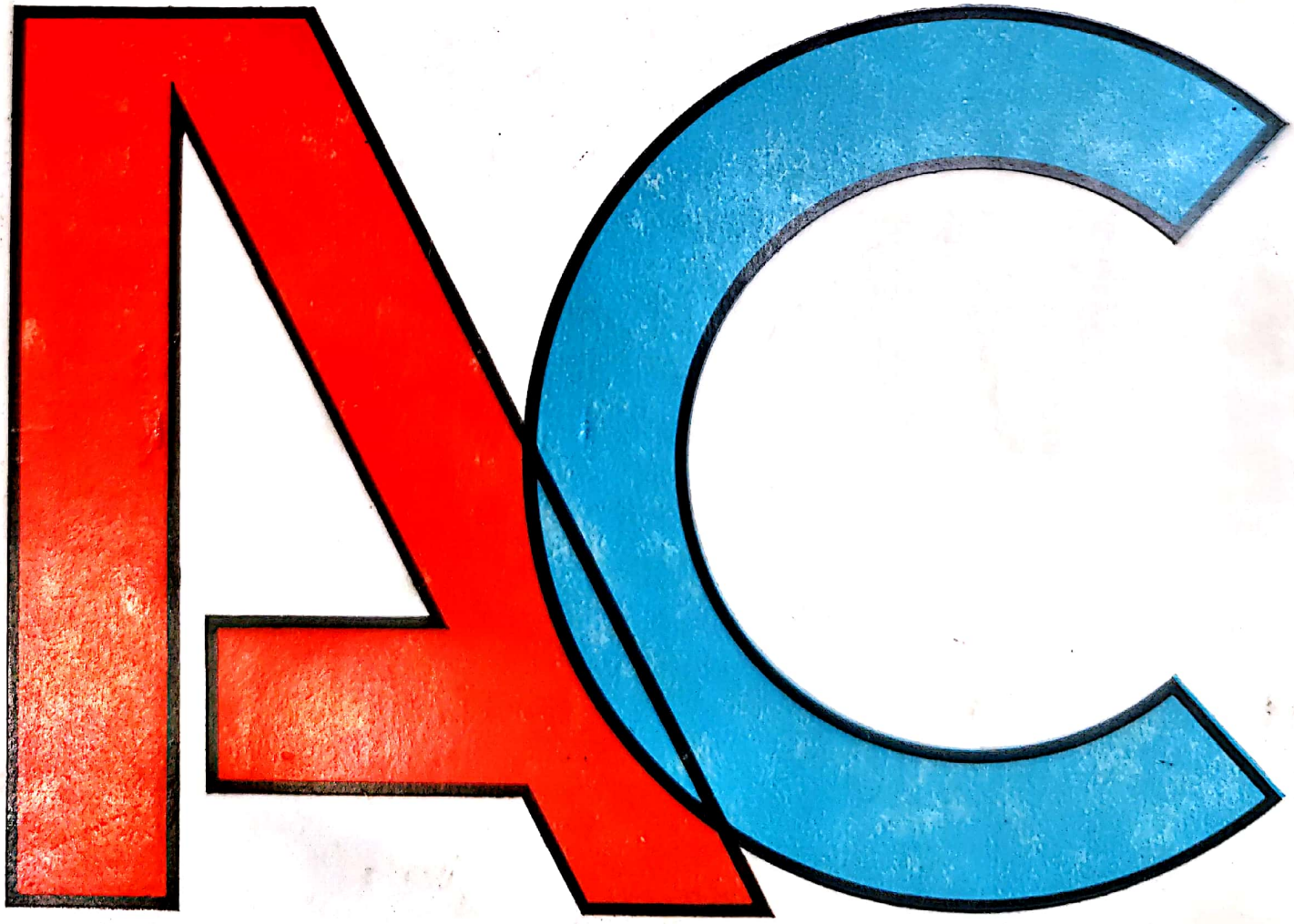
# analiza coproparazitologică

V. NITZULESCU V. CORIJESCU



Scanned with OKEN Scanner

# ANALIZA COPROPARAZITOLOGICĂ

constituie un îndreptar de mare utilitate practică pentru activitatea de rutină a medicilor de laborator, precum și valorificarea științifică a unei bogate experiențe a autorilor.

Materialul este sistematizat pe baza procesului tehnic de prelucrare coprologică, expunîndu-se mai multe metode în mod ierarhic, cu indicarea celei mai adecvate, astfel ca practicienii să se poată orienta în depistarea elementelor parazitare la examenul coproparazitologic.

Scanned with OKEN Scanner

VIRGIL NITZULESCU
Profesor doctor docent

VERONICA CORIJESCU
Doctor în medicină

# analiza coproparazitologică

Scanned with OKEN Scanner

# Prefață

*Am scris volumul de față cu gîndul de a veni în ajutorul medicului de laborator, care să găsească aici metodele și procedeele recent apărute în literatura universală, pe baza cărora să poată da rezultate cît mai corespunzătoare. Dacă o bună analiză ține în primul rînd de atenția și puterea de observație a cercetătorului, nu-i mai puțin adevărat că ține și de utilizarea de metode cît mai potrivite pentru fiecare categorie din paraziții care pot fi întîlniți în materialul analizat. Or, în literatura noastră medicală actuală lipsesc complet date noi în această direcție și multe din datele mai vechi au fost depășite. De aceea socotim că volumul de față umple un gol resimțit de medicii noștri.*

*Am stăruit mai mult asupra noii concepții a lui Bailenger privitoare la metodele difazice de analiză coproparazitologică, concepție fecundă, care permite o mai bună înțelegere a acestor metode și deschide un drum nou de perfecționare a lor.*

*În capitole speciale am arătat și metodele de numărare a elementelor parazitare, metodele de desenare a lor, precum și cele de măsurare, pentru ca medicii să poată să aprecieze cît mai just cantitatea elementelor existente, în unele cazuri speciale, să poată să le reproducă în desene și să le consemneze dimensiunile — atunci cînd vor întîlni elemente care li se par a fi noi sau particulare. Ei vor putea da astfel indicații prețioase și produce documente noi și utile.*

*Se atrage atenția medicilor de laborator asupra necesității de a consemna în buletinele de analiză coproparazitologică și prezența unor elemente neparazitare — care pot reprezenta mărturia unei anumite stări patofiziologice intestinale, de foarte multe ori rea-*



Scanned with OKEN Scanner

*lizată de paraziți, ca un efect al acțiunii lor asupra organismului gazdă. Dăm, de asemenea, un model după care ar trebui redactat buletinul de analiză.*

*Unii paraziți se găsesc în număr extrem de redus și, pentru punerea lor în evidență, este necesar să se recurgă la metode de cultură pe medii potrivite. De aceea am stăruit într-un capitol special asupra mediilor de cultură celor mai potrivite pentru cultivarea amibidelor, precum și a flagelatelor intestinale.*

*În sfîrșit, prezentăm o trecere în revistă a înfățișării elementelor parazitare susceptibile a fi întîlnite în analiza coproparazitologică, protozoare sub forma vegetativă, precum și în stadiul de chist, — precum și helminți în forma adultă — aceea larvară sau de ouă — arătînd caracterele morfologice de identificare, pentru a putea fi recunoscute cu ușurință de medici. O iconografie bogată însoțește descrierea lor.*

*Lucrarea se încheie cu un capitol de micologie. În general datele de micologie sînt mai puțin cunoscute de medicii de laborator și socotim că acest capitol le va putea fi de mare ajutor, permițîndu-le să se orienteze just în anumite cazuri în care fungii pot avea un rol important în dezlănțuirea unor fenomene patologice. Am stăruit în special asupra genului* Candida *— care e cel mai deseori întîlnit în analizele coprologice — dar au fost trecute în revistă și speciile genului* Geotrichum *— cu tabelul de identificare a lor — precum și genul* Criptococcus, *pentru care au fost menționate metodele de identificare.*

*Medicii de laborator, pentru care a fost scris acest volum, sînt rugați să ne ajute cu observații și sugestii asupra a ceea ce ei socotesc că nu a fost expus suficient de lămurit sau ar putea fi perfecționat într-o eventuală viitoare ediție.*

**Autorii**

Scanned with OKEN Scanner

# Tabla de materii


Pag.

**Recoltarea** . . . . . 9

**Metode de examinare** . . . . . 14

Examenul direct . . . . . 14
Examenul direct macroscopic . . . . . 14
Examenul direct microscopic . . . . . 15
Examenul direct microscopic în picătură groasă . . . . . 19

**Metode de concentrare a elementelor parazitare** . . . . . 22

Descrierea metodelor de concentrare . . . . . 23
Metode fizice de sedimentare . . . . . 24
Metode de flotaţie . . . . . 25
Metode de flotaţie forţată prin centrifugare . . . . . 33
Metode combinate : flotaţie şi sedimentare forţate prin centrifugare 36
Metode difazice . . . . . 37
Metode combinate : metode difazice şi metode hidrostatice . . 49

**Metode speciale pentru concentrarea larvelor de *Strongyloides stercoralis*** 54

Metoda de cultivare (îmbogăţire) a protozoarelor intestinale . . . 61
Cultivarea coccidiilor . . . . . 68
Metoda de îmbogăţire pentru helminţi . . . . . 69
Cultivarea larvelor de *Strongyloides stercoralis* . . . . . 69

**Metode speciale de depistare a unor elemente parazitare** . . . . 70

Căutarea ouălor de oxiuri . . . . . 70

Pag.

**Metode speciale de fixare şi colorare aplicabile la elementele parazitare în examenul coproparazitologic** . . . . . 76

Tehnici speciale pentru fixarea şi colorarea rizopodelor . . . . 76

**Metode speciale în studiul viermilor paraziţi** . . . . . 83

Plathelminţii . . . . . 83
Nemathelminţii . . . . . 87

**Numărarea elementelor parazitare** . . . . . 87

**Desenarea imaginilor microscopice ale elementelor parazitare** . . . 95

**Măsurarea elementelor parazitare** . . . . . 100

**Mersul analizei coproparazitologice** . . . . . 105

**Răspunsuri necorespunzătoare ale laboratorului** . . . . . 107

**Redactarea buletinului de analiză** . . . . . 111

**Dezinfecţia sticlăriei** . . . . . 112

**Descrierea elementelor parazitare susceptibile a fi găsite la analiză** . 113

**Protozoare parazite** . . . . . 113
Clasa Rizopodelor . . . . . 113
Genul Entamoeba . . . . . 114
Genul Endolimax . . . . . 121
Genul Pseudolimax (Iodamoeba) . . . . . 122
Genul Dientamoeba . . . . . 124
Paraziţii amoebidelor . . . . . 125
Clasa flagelatelor . . . . . 126
Sporozoare. Coccidii . . . . . 133
Ciliate . . . . . 135
Helminţi . . . . . 139
Cestode . . . . . 139
Trematode . . . . . 148
Distomieni cu habitat hepatic . . . . . 148
Distomatoze intestinale . . . . . 152
Distomatoze pulmonare . . . . . 155
Distomatoze sanguicole . . . . . 156
Nematode . . . . . 158



Scanned with OKEN Scanner

Pag.

**Elemente parazitare de trecere de origine animală, susceptibile a fi găsite în scaune** . . . . . 168

**Elemente neparazitare susceptibile a fi găsite în scaune** . . . . 173

**Examenul micologic** . . . . . 179

Clasificarea fungilor . . . . . 189
Mediile de cultură . . . . . 190

**Metode de studiu al fungilor** . . . . . 194

Cultura pe lamă . . . . . 194
Producerea de asce . . . . . 201
Producerea de filamente . . . . . 202
Zimograma . . . . . 204
Auxanograma . . . . . 209
Asimilarea azotului . . . . . 213
Alte reacţii biochimice utilizate pentru determinarea anumitor specii de *Candida* . . . . . 213
Identificarea speciei *Candida albicans* . . . . . 214
Alte specii ale genului *Candida* . . . . . 216
Speciile genului *Geotrichum* . . . . . 220
Caracterele genului *Criptococcus* . . . . . 222

*Blastocystis hominis* . . . . . 224

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

# Recoltarea

Să începem expunerea analizelor coproparazitologice cu aspectele legate de recoltarea şi trimiterea în laborator a materiilor fecale.

Prima problemă care se pune este aceea a necesităţii unei eventuale pregătiri prealabile a bolnavului. Acesta nu trebuie să fi ingerat, timp de cel puţin 3 zile înainte de recoltare, substanţe care ar îngreuia considerabil citirea rezultatelor probei analizate, şi anume : săruri de bismut şi de bariu, caolin, cretă, cărbune. De asemenea, să nu fi luat în acest interval de timp purgative uleioase, ca uleiul de ricină sau uleiul de parafină. Sînt autori care consideră necesar ca bolnavul să păstreze 3—4 zile înainte de analiză un anume regim alimentar — din care trebuie să lipsească anumite legume uscate sau verzi, care produc lambouri epiteliale întinse, unele fructe cu peliculă rezistentă, unele fructe cu seminţe mici (ca fragii şi smochinele), unele fructe cu concreţii pietroase (ca perele). O asemenea pregătire ar fi, fără îndoială, ideală, dar practic ar îngreuia pregătirile de analiză şi nu este primită bucuros nici de bolnav. Ceea ce reţinem e doar evitarea concreţiilor pietroase şi a excesului unor legume care produc lambouri epiteliale (ca varza). În rest, un bun microscopist va putea face faţă analizei chiar în lipsa unei pregătiri dietetice prea riguroase.

O cerere mult mai justificată — la care se raliază toţi cercetătorii — este evitarea de a se amesteca scaunul cu urina, în special atunci cînd e vorba de căutarea de protozoare în stare vegetativă.

Întrebarea care se pune apoi este aceea a cantității de materii fecale ce urmează a fi trimisă laboratorului. În general, această cantitate nu este nevoie să depășească volumul a 3 nuci. Este recomandat, însă, ca acest volum redus să provină din mai multe regiuni ale scaunului eliminat, deoarece elementele parazitare nu sînt uniform repartizate în masa scaunului, ele putînd să se găsească, mai cu deosebire, într-o anumită regiune.

Trimiterea la laborator a scaunului în întregime nu este necesară decît atunci cînd sînt de rezolvat probleme cu totul speciale. Spre exemplu, găsirea scolexului de tenie sau de botriocefal prin decantări repetate, după ce bolnavul a primit anumite medicamente (ca Yomesanul) care rup legătura dintre scolex și restul strobilei. De multe ori, în asemenea cazuri am reușit să găsim scolexul — și deci să asigurăm vindecarea bolnavului — prin examinarea scaunului în întregime.

De asemenea, în cazurile unei tricostrongiloze — în care viermii sînt în general puțin numeroși — o decantare repetată a scaunului în întregime va permite găsirea puținilor viermi eliminați printr-un medicament adecvat — cum ar fi Tiabendazolul. Asemenea cazuri, cu totul speciale, trebuie indicate anume de către medicul care cere analiza de laborator.

O cerință justificată a laboratorului este aceea a unui scaun cît mai recent emis. Nu trebuie însă să se meargă prea departe. Cererea de scaune emise chiar în laborator — pentru ca examinarea lor să se facă fiind calde încă, nu e justificată decît în cazuri deosebit de rare, cum ar fi, spre exemplu, trecerea experimentală a 20 ml scaun pe cale intrarectală la pisică pentru diagnosticarea unei amibiaze, ca *Entamoeba histolytica*. În rest, chiar atunci cînd e vorba de amibe dizenterigene, putința însămînțării scaunului pe medii adecvate ne va permite să diagnosticăm diversele amibide chiar în scaune emise de bolnav acasă la el și aduse cît mai curînd după aceea în laborator. Necesitatea unui examen cît mai rapid după emisiunea fecalelor — dar nu scaune „calde încă" — se impune și în cazul prezenței ouălor de ankilostomide sau de trichostrongilide (care se divid repede și pot și eclozа la puțin timp după emisiune), pentru a evita confundarea larvelor eclozate cu larvele rabditoide de *Strongyloides stercoralis*. De asemenea, pentru a găsi încă vii și mobile unele flagelate cavitare, ca *Trichomonas intestinalis* sau *Giardia intestinalis*. Dimpotrivă, unele chisturi de amibide cîștigă prin examinarea lor după 24 de ore. Spre exemplu, chisturile de *Entamoeba histolytica*, care la eliminare nu posedă decît un nucleu, suferă ulterior diviziunea



Scanned with OKEN Scanner

acestuia pînă la stadiul de 4 nuclee, care reprezintă înfăţişarea sa caracteristică.

O problemă dezbătută încă de unii medici de laborator este aceea a recoltării materiilor fecale dintr-o singură zi sau din 3 zile în şir. Ne raliem hotărît la recoltarea dintr-o singură zi, pentru mai multe motive.

Dacă unele elemente parazitare nu se elimină zilnic, ci intermitent — cu existenţa deci între zilele de eliminare şi de perioade negative — adunarea materialului din 3 zile în şir are prea puţine şanse să rezolve problema găsirii lor. Cele mai multe probabilităţi sînt ca cele 3 zile alăturate să se afle în aceeaşi perioadă de eliminare sau de neeliminare. Este cu mult mai logic să se efectueze 3 analize la intervale de 6—8 zile, fiecare din cîte o singură zi, decît o analiză din 3 zile alăturate.

Pe de altă parte, recoltarea din 3 zile reprezintă pentru bolnav o operaţie fastidioasă, iar pentru medicul de laborator o îngreunare a citirii rezultatelor, prin faptul că fungii existenţi în scaun au putinţa să se înmulţească în aceste 3 zile considerabil, împiedicînd astfel buna observare a celorlalte elemente parazitare.

Se pot totuşi efectua analize din mai multe zile în şir (chiar mai mult de 3 zile), cu evitarea dezvoltării fungilor şi a reacţiilor fermentative, dar cu condiţia ca recoltarea să se facă în soluţie fixatoare, ca spre exemplu o soluţie de formol, în care, în fiecare zi, se va depune o cantitate mică de materii fecale. Soluţia poate avea formula :

| | |
|---|---|
| Formol din comerţ . . . . | 10 g |
| Glicerină . . . . . | 10 g |
| Apă . . . . . | 90 g |

În aceste condiţii chisturile şi ouăle parazitare se conservă nealterate. În momentul examinării porţiunile zilnice vor fi amestecate şi din mestecul realizat se vor alege alte cîteva porţiuni, care vor fi supuse analizei.

**Expedierea materialului fecal** în laborator se va face în recipiente potrivite. Atragem atenţia asupra faptului că vechea metodă de trimitere a materiilor fecale în cutii de chibrituri trebuie total părăsită. Sînt de preferat cutiile de plastic utilizate în comerţul farmaceutic pentru diverse drajeuri medicamentoase — şi în special cutiile mai înalte (tip vitamina $C_{200}$ — înălţime 4,5 cm, diametru sus 3,5 cm). Mai puţin bune (ca avînd o capacitate mai redusă) sînt cutiile plate (tip vitamină B complex, faringosept etc.) (2 cm înălţime, 5 cm diametru). Aceste cutii de material plastic



Scanned with OKEN Scanner

se închid îndeajuns de bine și evită riscul de infectare a personalului care le manipulează. Ele nu trebuie însă să fie umplute pînă sus — ci numai pe jumătate — avîndu-se în vedere putința de fermentare a unor probe fecale, fermentare care poate merge, în unele cazuri, pînă la o „explodare" prin care capacul să fie aruncat. Recipientele trebuie să fi fost în prealabil bine spălate și bine uscate.

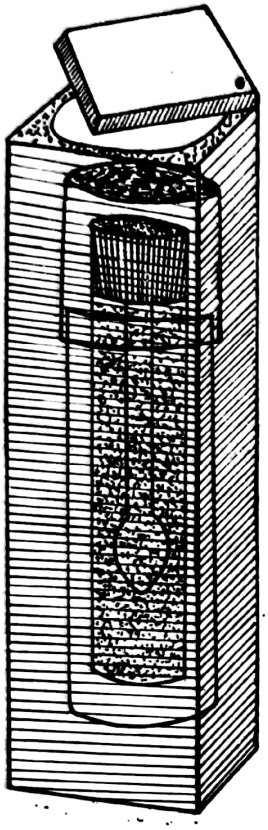


*Fig. 1.* — Recipient de recoltare pentru expediere la distanțe mari. Materiile fecale se găsesc într-un tub de sticlă, introdus într-un cilindru de tablă — la rîndul său introdus într-un bloc paralelipipedic de lemn.

Cînd e vorba de o trimitere a materialului cu trenul, la oarecare distanță, sînt de preferat recipientele alcătuite dintr-o eprubetă scurtă de sticlă groasă, închisă cu un dop de plută. În fața inferioară a dopului, se va înfige o linguriță sau o languetă de tablă. Tubul va fi introdus într-un cilindru de tablă și acesta, la rîndul său, într-un bloc paralelipipedic de lemn scobit, pentru a-l conține, și închis, la rîndul său, cu un capac de lemn (fig. 1).

Recipientul — de orice tip — trebuie să poarte, lipită pe el, o etichetă, care va conține :

— numele și prenumele bolnavului ;

— adresa;

— vîrsta.

Socotim aceste date ca absolut necesare. Ele vor permite diferențierea a două probe provenind de la bolnavi cu nume și pronume identice.

De asemenea, ele vor putea, pe de altă parte, atrage atenția asupra unor erori, care eventual s-ar fi putut produce în cursul examinărilor. Așa, spre exemplu, apariția de ouă de *Hymenolepis diminuta* sau de *Dipylidium caninum* la bolnavi de vîrstă adultă reprezintă cazuri excepționale, care sugerează ideea intervenirii unor erori de etichetare. Nu socotim necesară pentru laborator comunicarea anamnezei bolnavului. Socotim însă necesară indicarea parazitului bănuit, pe baza anamnezei făcute de medic. În arsenalul de metode de analiză coproparazitologică, există unele metode mai potrivite pentru găsirea unor anumiți paraziți. Spre exemplu, ouăle de *Hymenolepis nana* sau de *Ankylostoma duodenale* apar cu suficientă frecvență



Scanned with OKEN Scanner

în metodele de analiză în care se utilizează flotația cu clorură de sodiu. Alte ouă, mai grele, necesită flotația cu un lichid mai dens sau o metodă de analiză difazică. Pentru ca laboratorul să utilizeze metoda cea mai adecvată, trebuie să fie încunoștiințat de ceea ce vrem să se caute.

O problemă care trebuie luată în considerare este și aceea a temperaturii la care trebuie păstrate probele de materii fecale, de la emiterea lor pînă la examinare, în special cînd e vorba de forme vegetative de protozoare intestinale (amibe, flagelate). Temperatura de 37° nu este recomandată. Ea activează procesele fermentative, care sînt dăunătoare, și măresc exagerat numărul bacteriilor, iar pe de altă parte grăbesc desicarea, fapt de asemenea dăunător. E de preferat păstrarea materialului la temperatura camerei.

**Recoltarea întovărășită de fixare imediată.** Se poate recolta zilnic, mai multe zile în șir, cîte o cantitate mică de materii fecale, în următorul fixator :

| | |
|---|---|
| Formol din comerț . . . . | 10 ml |
| Glicerină . . . . . | 10 ml |
| Apă . . . . . | 90 ml |

O altă metodă este recoltarea în fixatorul lui Schaudinn (sublimat alcoolic), asociat cu alcool polivinilic. Asupra acestei metode vom reveni mai jos.

Burrows (1967) recomandă pentru protozoare un alt lichid fixator, cu următoarea formulă :

| | |
|---|---|
| Fenol alb cristalizat . . . | 20 g |
| Ser fiziologic 0,85% . . . | 825 ml |
| Alcool etilic 95° . . . . | 125 ml |
| Formol . . . . . | 50 ml |

Acest fixator a primit numele de P.A.F. (phenol, alcool, formol).

Într-un borcan de 50 ml, cu gît larg și dop șlefuit, se introduc 30—35 ml P.A.F. și 3—4 g material fecal. Se aleg din masa fecală porțiunile cele mai moi. Se emulsionează cu o baghetă de sticlă. Proba se poate examina peste o oră, dar și peste cîteva săptămîni, fără a se fi produs nici o deteriorare a elementelor parazitare. Fixarea e imediată. Amibele mor cu pseudopodele extinse. Soluția de fenol 2% fixează nucleele cu delicatețe și nu coagulează citoplasma. Este bine ca fixatorul să fie preparat cît mai proaspăt, chiar de două ori pe săptămînă (Baughn și Morales).

Pentru colorarea protozoarelor fixate cu lichidul de mai sus, cele mai bune rezultate le dă thionina 0,01% în apă distilată.



Scanned with OKEN Scanner

# Metode de examinare

## Examenul direct

Primul timp al examenului la care trebuie supusă proba de materii fecale e acela al examenului direct.

Se va face examenul direct atît macroscopic, cît şi microscopic.

### Examenul direct macroscopic

Se va nota :

— *culoarea* : de la galben deschis, la brun şi la negru ;

— *consistenţa* : scaune dure, moi, lichide, păstoase, gelatinoase, aderente, conţinînd sau nu mucus, glere cu sînge sau sînge fără glere ;

— *mirosul* ; fad sau putrid ;

— *pH-ul* : se ia cu hîrtie de turnesol, care arată o reacţie acidă, alcalină sau amfoteră. M. Langeron recomandă diluarea materiilor fecale cu apă distilată neutră. După decantare, se caută pH-ul apei cu hîrtie-reactiv adecvată.

Datele de mai sus prezintă interes întrucît sînt legate de starea funcţională a tubului digestiv. Unele din ele ne atrag în mod deosebit atenţia în direcţia existenţei unor paraziţi. Spre exemplu, glerele sanguinolente pot conţine forme vegetative de amoebide *(Entamoeba histolytica)*. În scaunele lichide se va căuta prezenţa eventuală a unor flagelate intestinale *(Trichomonas, Chilomastix)*.

**Prezenţa de elemente parazitare.** Examenul macroscopic poate descoperi prezenţa unor helminţi ca oxiuri, proglote de cestode *(Taenia solium, Taenia saginata, Hymenolepis diminuta, Dipilidium caninum)*. Mulţi bolnavi introduc anume în borcanul cu materii fecale unul sau doi oxiuri, pe care i-au cules de pe lenjerie sau din regiunea perianală, şi rămîn foarte contrariaţi dacă medicul de laborator nu i-a observat şi a dat probei respective un răspuns negativ. M.-L. Cavaroc explică, în parte, asemenea răspunsuri eronate, prin aceea că oxiurii în contact cu serul se usucă, se subţiază progresiv, îşi alterează culoarea, căpătînd-o pe aceea a mate-



Scanned with OKEN Scanner

riilor în care sînt înglobaţi şi devin de nerecunoscut. Această autoare recomandă, în ceea ce priveşte oxiuraza, examinarea scaunelor „calde" — în care aceşti viermi apar cu mai multă uşurinţă — sau tratarea întregii mase fecale cu un lichid hipertonic, care ridică oxiurii la suprafaţă.

## Examenul direct microscopic

O mică porţiune din masa fecală e pusă direct între lamă şi lamelă şi privită la microscop. Cînd scaunele sînt foarte apoase nu este necesară adăugarea unei picături de lichid, care să dilueze masa fecală. Preparaţia e bine făcută dacă rămîne suficient de transparentă, pentru a se putea citi prin ea literele unei file tipărite. Ea trebuie privită la început cu un obiectiv slab. E bine să coborîm puţin condensatorul microscopului. Amibele şi chisturile lor — precum şi chisturile de *Giardia* sau de alte protozoare — apar atunci refringente şi uşor de reperat. Vom muta apoi lama, pentru ca regiunea respectivă să vină în centrul cîmpului, şi vom înlocui obiectivul cu unul mai puternic, care ne va permite să observăm detalii de organizare. Examenul microscopic direct e foarte indicat pentru găsirea flagelatelor şi rizopodelor în stare vegetativă şi ne permite să urmărim modul lor de mişcare şi unele detalii de organizare.

Cînd consistenţa materiilor este prea mare, este necesară adăugarea unei picături de lichid, care să le dilueze. Ho Thi Sang atrage atenţia asupra faptului că nu e indiferent lichidul adăugat. Acest lichid poate fi ser fiziologic (încălzit la 37° C sau la temperatura laboratorului), dar poate fi şi apă de la robinet. Or aceasta din urmă conţine în general hipocloriţi, care lizează blastocistii, precum şi formele vegetative de *Dientamoeba fragilis*. Sub influenţa apei de robinet blastocistii îşi pierd refringenţa iniţială şi sfîrşesc prin a se distruge, putînd astfel să-i diferenţiem cu uşurinţă de chisturile de amibe, care rezistă. La fel, formele vegetative de *Dientamoeba fragilis* îşi pierd rezistenţa, protoplasma lor se lizează şi apar limpede cele 2 nuclee, înconjurînd o mare vacuolă (ceea ce le apropie astfel, ca aparenţă, de *Blastocystis hominis*). După Ho Thi Sang, chiar şi formele vegetative de *Pseudolimax bütschlii* sînt repede lizate de apa de robinet, scoţîndu-se astfel în relief mai bine structura nucleului lor.

**Colorarea cu eozină.** Pentru scoaterea în evidenţă a chisturilor de protozoare se poate adăuga, la picătura de lichid în care este emulsionată o picătură de materii fecale, o picătură de soluţie 2% de eozină. Toate elementele moarte din preparaţie, cu excepţia



Scanned with OKEN Scanner

bulelor de grăsime şi a grăunţelor de amidon, apar colorate în roşu, pe cîtă vreme chisturile încă vii de protozoare (amibe, giardii, chilomastix) rămîn necolorate şi evidente pe fondul roşu al preparaţiei.

Dacă se face o soluţie de eozină numai 1% în ser fiziologic, atunci şi formele vegetative de amoebide se menţin vii. Ele rămîn necolorate şi mişcările lor pot fi foarte bine observate pe fondul roşu al preparaţiei (Ho Thi Sang).

**Colorarea cu lugol.** Rezultate încă şi mai bune se obţin prin adaosul unei picături de soluţie iodo-iodurată „lugol" în care se va face emulsionarea particulelor fecale. Nu numai chisturile în sine sînt scoase în evidenţă, dar şi unele structuri ale lor, ca nuclee sau flegeli (care alcătuiesc un fel de diagonală, în lungul chisturilor de *Giardia*).

Nu există însă concordanţă între autori în ceea ce priveşte compoziţia soluţiei Lugol. Maurice Langeron şi majoritatea autorilor propun formula lugolului dublu, constînd din iod 1 g, iodură de potasiu 2 g şi apă distilată 100 g. Alţi autori folosesc un lugol încă şi mai concentrat, în care, la 1 g iod şi 2 g iodură de potasiu pun numai 50 ml apă distilată. Grassi — potrivit cercetărilor făcute de Langeron — propunea, pentru punerea în evidenţă a flagelilor giardiilor, o soluţie iodo-iodurată, în care o parte de iodură de potasiu era întîi dizolvată în de trei ori aceeaşi cantitate de apă şi apoi soluţia era saturată cu iod.

Pentru prepararea lugolului, — oricare formulă am alege-o — se face în prealabil o soluţie foarte concentrată de iodură de potasiu, în care se introduce cantitatea determinată de iod, şi apoi soluţia se completează cu apă distilată, pînă la cantitatea dorită : 200, 100 sau 50 ml.

D'Antoni a preconizat o soluţie iodo-iodurată de o preparaţie mult mai dificilă, întrucît pretinde o cîntărire extrem de exactă a ingredientelor, pentru a obţine, cu precizie de pînă la a patra zecimală, o soluţie de 1% de iodură de potasiu, ţinînd seama de faptul că iodura de potasiu e delicvescentă şi greutatea ei trebuie corectată în raport cu această delicvescenţă. După Craig şi Faust soluţia D'Antoni s-ar putea conserva mai bine decît lugolul obişnuit, ar pătrunde mai bine în celule şi ar colora mai bine.

Edward Markell şi Marietta Voge nu consideră necesară cîntărirea aşa de riguroasă cerută de d'Antoni şi propun ceea ce ei numesc un „d'Antoni modificat", folosind în principiu aceeaşi formulă : iod 1,5 g, iodură de potasiu 1 g şi apă distilată 100 ml. Adaugă încă faptul că soluţia (care se va păstra în sticle brune) nu se va utiliza înainte de 4 zile de la preparare.



Scanned with OKEN Scanner

În sfîrşit, alţi autori inversează proporţia între iodura de potasiu şi iod, punînd în 100 ml apă 2 g de iod şi numai 1 g de iodură de potasiu (Gradwohl).

Dacă cu formula lui D'Antoni noi am obţinut rezultate mai frumoase decît cu lugolul dublu, rezultate la fel de frumoase am obţinut şi cu această din urmă formulă, a cărei preparare e cu mult mai uşoară şi pe care o recomandăm.

**Colorarea cu lugol şi thionină (metoda Bidegaray).** Pentru o evidenţiere mai bună a cromatinei nucleare poate fi utilizată thionina. Bidegaray recomandă prepararea unei soluţii de thionină fenicată, după formula lui M. Nicolle, şi anume :

| | |
|---|---|
| Soluţie saturată de thionină în alcool 60° . . . | 1 parte |
| Apă fenicată 2% . . . . . | 4 părţi |

Se pun pe lamă 3 picături alăturate :

— o picătură de emulsie de materii fecale ;

— o picătură de lugol dublu ;

— o picătură din soluţia de thionină fenicată.

Se amestecă cele trei picături cu colţul unei lame şi se acoperă amestecul cu o lamelă.

Nucleele chisturilor de protozoare apar cu o deosebită claritate.

**Colorare şi fixare simultane.** O metodă care dă rezultate mulţumitoare este aceea a lui Sapero şi Lawless, în care se utilizează un reactiv constituit din mertiolat de sodiu, iodul din soluţia lugol, formol şi eozină. După iniţialele celor 3 ingrediente principale metoda e cunoscută şi sub numele de M.I.F. (mertiolat, iod, formol).

I. Se porneşte de la tinctura de mertiolat, a cărei compoziţie este următoarea :

| | |
|---|---|
| Mertiolat de sodiu . . . | 1 g |
| Monoetanolamină . . . | 1 g |
| Alcool de 90° . . . . . | 525 ml |
| Acetonă . . . . . | 100 ml |
| Eozină . . . . . | 15 ml |
| Apă distilată q.s. pentru . | 1 000 ml |

Această soluţie se găseşte în comerţ gata preparată, în flacoane mari, de fabrica Lilly. Ea se poate conserva indefinit. Să o numim soluţie „princeps".

341.837
„GH. ASACHI"
IAŞI



Scanned with OKEN Scanner

II. *Pentru utilizare*, o porţiune din ea se diluează cu o soluţie constînd din apă, formol din comerţ şi glicerină, după formula :

| | |
|---|---|
| Tinctură de mertiolat, soluţie „princeps“ | 200 ml |
| Formol din comerţ | 25 ml |
| Glicerină | 5 ml |
| Apă distilată | 250 ml |

Se obţine astfel o soluţie de mertiolat, formol şi eozină — care nu poate fi conservată decît cîteva luni. Ea trebuie păstrată în flacoane de sticlă brună.

III. Se prepară, pe de altă parte, o soluţie de lugol, după formula :

| | |
|---|---|
| Iod metaloid | 0,5 g |
| Iodură de potasiu | 1 g |
| Apă distilată | 10 ml |

Şi această soluţie de lugol 5% (preparată după metoda arătată la pag. 16) se păstrează în sticle brune. Ea nu se conservă decît cel mult 3 săptămîni.

IV. În momentul utilizării se amestecă 0,15 ml lugol (3 picături) cu 2,35 ml mertiolat-formol (47 picături). Amestecul se face vărsînd mertiolatul în lugol. Pentru aceasta, se pun în fundul unui tub de hemoliză, cu o pipetă Pasteur, 3 picături lugol. În alt tub de hemoliză se pun 47 de picături de mertiolat-formol şi conţinutul acestui din urmă tub va fi răsturnat în tubul conţinînd cele 3 picături de lugol.

Se închide cu degetul tubul conţinînd amestecul de mai sus, se răstoarnă lin — o singură dată (Ho Thi Sang) —, pentru a se realiza amestecul celor 2 substanţe, şi se introduce o mică porţiune de materii fecale (un sfert de gram), care se triturează cu o baghetă fină de sticlă (o pipetă Pasteur închisă la capăt). Se lasă să se sedimenteze fecalele. În masa de sediment protozoarele se găsesc în pătura superioară. Se ia din această pătură o picătură care se examinează la microscop.

Se poate proceda la fel — utilizînd cantităţi mai mari decît cele arătate — şi deci eprubete mai mari, în care pot fi păstrate un timp foarte îndelungat, fixate şi colorate, elementele parazitare existente în probele de scaun.



Scanned with OKEN Scanner

Pentru colorarea extemporanee între lamă şi lamelă a unei picături de scaun se recomandă şi procedeul următor :

| | |
|---|---|
| Tinctură de mertiolat pură (Lilly) — soluţie „princeps" 1/1 000 . . . . . | 7,75 ml |
| Lugol 5% (a cărui formulă a fost dată mai sus) preparat proaspăt (cel mult de o săptămînă) . . | 1 ml |
| Formol din comerţ . . . . . | 1,25 ml |

Acest amestec nu se poate păstra decît cîteva ore. Îl preparăm deci zilnic, pentru cercetările din ziua respectivă.

Se face o emulsie de materii fecale — pe o lamă de microscopie — într-o picătură de ser fiziologic. Emulsia va fi de 2 ori mai groasă decît aceea care se face pentru un examen microscopic direct. Ea se amestecă cu o picătură din reactivul preparat şi se acoperă cu o lamelă. Se lutează lamela cu vaselină, pentru a împiedica desicarea, şi se aşteaptă 20—30 de min., după care se examinează (Ho Thi Sang).

După cum am arătat mai sus, metoda cu mertiolat-iod-formol-eozină este cunoscută şi sub numele de metoda MIF. Într-un studiu, deosebit de interesant, asupra utilizării acestei metode pentru aprecierea cantitativă a ouălor de helminţi, F. L. Dunn (1968) — pe baza faptului că mertiolatul este sinonim cu Thiomersalul — denumeşte această metodă TIF.

### Examenul direct microscopic în picătură groasă

Picătura de material fecal diluat în apă nu trebuie să fie prea groasă. Diluţia materiilor fecale trebuie să fie făcută în aşa fel ca să se poată citi, prin transparenţa preparatului, caracterele de imprimerie. Rezultă că în cazurile unui parazitism puţin accentuat, într-o asemenea picătură elementele parazitare sînt prea puţin numeroase. Am avea avantaje dacă am găsi putinţa să examinăm o picătură cu mult mai groasă şi, implicit, mai bogată în elemente parazitare.

Există mai multe metode de acest tip. Vom cita dintre ele metoda Kortenhaus, metoda japoneză Kato şi Miura, precum şi metoda Borda şi Pellegrino.

**Metoda Kortenhaus.** Se emulsionează o cantitate de cîteva grame de materii fecale într-o soluţie de acid acetic 10%, pentru a se realiza un amestec omogen, relativ gros. Cîteva picături din acest amestec sînt puse alături pe o lamă de microscopie şi reunite, cu ajutorul unei baghete de sticlă, cu care materialul este întins pe lamă, în forma unei figuri dreptunghiulare, de mărimea



Scanned with OKEN Scanner

unei lamele 32 × 22. Se lasă să se usuce 24 de ore, după care suprafaţa uscată se acoperă cu o picătură mare de ulei de cedru sau de parafină şi cu o lamelă de dimensiune corespunzătoare. Ouăle de helminţi apar foarte clar pe un fond galben-brun, reprezentat de materialul fecal macerat în acidul acetic. Se poate pune şi Balsam de Canada atunci cînd vrem să obţinem preparate durabile.

**Metoda Kato şi Miura.** Preconizată încă din 1954, metoda a fost reconsiderată şi readusă în atenţie în anii din urmă, pentru calităţile preţioase pe care le prezintă, şi anume :

— utilizează, ca şi metoda Kortenhaus, o cantitate de materii mai mare cu mult decît aceea necesară unui preparat de examinare directă, fapt care duce inclusiv la multiplicarea şanselor de găsire a elementelor parazitare ;

— înlocuieşte lamelele obişnuite de microscopie cu pătrăţele de celofan, de aceleaşi dimensiuni (22 × 22), decupate dintr-o foaie de celofan, care se găseşte uşor şi la un preţ foarte redus în comerţ. Se realizează prin aceasta o economie nu numai ca valoare bănească, dar şi ca muncă, întrucît foiţele utilizate nu se spală ci se aruncă după utilizare, economisindu-se timpul şi munca laborantului însărcinat cu recuperarea lamelelor.

După decupare pătrăţelele de celofan sînt introduse într-un mic cristalizor, unde sînt acoperite cu o soluţie, avînd următoarea formulă :

| | |
|---|---|
| Glicerină . . . . . | 50 ml |
| Soluţie apoasă de verde de malahit 3% . . | 0,5 ml |
| Apă distilată . . . . . | 50 ml |

În momentul utilizării ele trebuie să fi stat în această soluţie cel puţin 24 de ore, timp în care celofanul se impregnează cu glicerină.

*Executarea analizei.* Pe o lamă obişnuită de microscopie se pun materii fecale, într-o cantitate de 7 ori mai mare decît era necesar pentru confecţionarea unui preparat de examinare directă obişnuit (adică 70—80 mg, în loc de 10 mg). Aceste materii au fost în prealabil tamizate printr-o sită metalică — fără să fi fost diluate — după un procedeu ingenios, arătat de Larry Martin şi Paul Beaver în 1968, constînd din aplicarea unei site metalice şi presarea cu ea pe suprafaţa materialului fecal. Porţiunile nefibroase, capabile de a pătrunde prin ochiurile sitei, o vor face, ca o consecinţă a presiunii exercitate. Ele sînt culese cu o baghetă de lemn sau sticlă, raclînd suprafaţa superioară a sitei ; din masa culeasă se vor pune pe lamă circa 70 mg de material fecal, după care se extrage cu o pensă o foiţă de celofan din soluţia arătată



Scanned with OKEN Scanner

şi se acoperă cu ea materiile. Prin presiuni exercitate pe suprafaţa foiţei, materialul fecal se întinde uniform, într-un strat mai mult sau mai puţin gros. Martin şi Beaver propun a întoarce lama cu foiţa de celofan în jos şi a o presa contra unei suprafeţe netede şi absorbante, cum ar fi o coală de hîrtie de filtru groasă şi moale — pusă pe o suprafaţă netedă — pînă ce masa fecală se va fi întins uniform şi îndeajuns.

Preparatul astfel confecţionat nu trebuie examinat imediat, ci după trecerea unui interval de timp de cel puţin 30 de min. (mai bine 1 oră), interval în care se produce clarificarea materialului. Observarea la microscop se face cu o lumină puternică, iar verdele de malachit adăugat la soluţie joacă rolul de filtru pentru lumina puternică necesară.

Preparatele obţinute cu această metodă sînt îndeajuns de clare pentru a scoate în evidenţă ouăle de helminţi. Martin şi Beaver afirmă, însă, că prin această metodă nu pot evidenţia chisturile de protozoare. Noi am găsit în unele cazuri şi chisturi de amoebe sau de giardii — ba chiar şi elemente paraparazitare, cum sînt cristalele Charcot-Leyden.

**Metoda Edgardo Borda şi I. Pellegrino.** Autorii de mai sus au modificat metoda Kato şi Miura, înlocuind apa glicerinată cu următoarea soluţie prezervativă şi clarificantă, pe care o numesc soluţia P.C. („preservative clearing").

Polietilenglicol nr. 300 . . . . . 1 parte
Formol . . . . . 1 parte
Sol. saturată ClNa . . . . . 2 părţi

a) Pentru prepararea soluţiei P.C. se amestecă separat, în părţi egale, formolul cu soluţia saturată de clorură de sodiu. Deci 1 : 1.

b) Pe de altă parte, se amestecă separat, tot în părţi egale, polietilenglicolul şi soluţia saturată de clorură de sodiu. Deci 1 : 1.

c) Cele două amestecuri realizate separat se întrunesc în părţi egale. Va rezulta soluţia P.C. cu elementele componente în proporţiile de 1 : 1 : 2.

Lamelele vor fi tot de celofan — care se păstrează înmuiate în soluţia prezervativă. Se pot utiliza însă şi lamele constituite din polietilen, care se păstrează uscate.

Materiile fecale se tamizează după metoda Martin şi Beaver, cu o sită metalică, pe care o aplicăm deasupra lor şi o apăsăm, în aşa fel ca prin ochiurile sitei să treacă porţiuni din masa fecală, care se recoltează cu o baghetă sau o spatulă de sticlă sau de lemn.

Se procedează apoi în modul următor :

a) 20—30 mg materii fecale se amestecă pe lamă cu 0,02—0,03 g soluţie P.C. ;



Scanned with OKEN Scanner

b) se acoperă cu lamela de celofan sau de polietilen ;

c) se întoarce lama cu lamela în jos şi se presează pe o suprafaţă plată şi moale. Masa fecală se întinde — prin presiune — sub lamelă, acoperind o suprafaţă de 20—25 mm în diametru.

Dacă s-au utilizat lamele de celofan, presarea se face pe o foaie de hîrtie absorbantă.

Autorii găsesc metodei lor următoarele avantaje, faţă de metoda Kato :

1. preparatele se pot examina imediat, fără a mai aştepta un timp de clarificare ;

2. ouăle sînt bine conservate ; în special ouăle de *Schistosoma* nu sînt deformate ;

3. preparatele pot fi conservate nealterate, 4 luni dacă s-a lucrat cu lamele de polietilen. Dacă s-a lucrat cu lamele din celofan, încep să apară după o zi cristale de clorură de sodiu, ceea ce îngreuiază examinarea microscopică.

Pentru analiza cantitativă lama de microscopie e cîntărită mai înainte şi recîntărită după ce s-au pus pe ea cele 20—30 mg fecale. Se numără ouăle găsite şi se calculează cantitatea la 1 g.

# Metode de concentrare a elementelor parazitare

## (chisturi de protozoare şi ouă de helminţi)

Unii autori utilizează, pentru metodele pe care le vom descrie mai jos, caracterizarea de „metode de îmbogăţire". Socotim că termenele „metode de concentrare" şi „metode de îmbogăţire" nu sînt sinonime.



Scanned with OKEN Scanner

Fiecare din ele are o altă sferă de aplicare. Atunci cînd facem ca elementele cuprinse într-o masă fecală cu mult mai mare să se adune într-una cu mult mai mică — realizăm o concentrare a lor. Îmbogăţirea se realizează prin multiplicarea elementelor existente, care nu puteau fi găsite din cauza rarităţii lor. Prin metode de îmbogăţire trebuie deci înţelese metodele de cultivare a elementelor parazitare pe medii adecvate.

Concentrarea elementelor parazitare se poate realiza prin folosirea diferenţei de densitate dintre ele şi mediul în care sînt introduse. Metodele care folosesc acest principiu *fizic* al diferenţei de densitate pot fi de *sedimentare*, atunci cînd, fiind introduse într-un mediu de o densitate mai mică, elementele parazitare cad la fundul recipientului, unde se vor concentra. Ele pot, pe de altă parte, să „floteze", atunci cînd, introduse într-un mediu mai dens, ele vor avea tendinţa de a se urca la suprafaţă, unde se concentrează.

Un al doilea principiu folosit pentru concentrarea elementelor parazitare este acela al „metodelor difazice". Aceste metode au fost considerate, pînă nu de mult, ca metode chimice, prin aceea că folosesc lichide care solubilizează unele particule din materiile fecale — reducînd masa elementelor figurate. Bailenger a arătat că modul lor de acţiune e altul. Termenul de „metode difazice" va fi mai bine lămurit cînd vom ajunge la capitolul respectiv.

## Descrierea metodelor de concentrare

**Tamizarea.** Primul timp al oricărei analize coproparazitologice de concentrare, atunci cînd dorim un rezultat cît mai precis, este acela al tamizării. El constă din diluarea materiilor fecale cu ser fiziologic şi a trecerii materialului, astfel diluat, printr-o sită cu ochiuri foarte mici, care să reţină particulele mai grosolane, mari, şi să lase să treacă numai particulele mai fine, împreună cu care trec şi elementele parazitare (chisturi de protozoare şi ouă de helminţi). Diluarea se poate face într-un flacon de sticlă cu gît larg şi dop şlefuit, de o capacitate de 50 ml, ajutîndu-ne şi de cîteva perle de sticlă. Acestea, prin agitare, sfarmă particulele dure din masa fecală şi liberează din ele elementele parazitare. Rezultă un lichid cît mai omogen. El trebuie trecut acum prin sită. Sînt de evitat sitele din pînză sau din orice ţesut vegetal. Ele reţin o parte din ouă în ochiurile lor. Sînt de utilizat numai sitele metalice, de preferinţă din bronz, cu ochiuri între 1 mm şi 0,5 mm pe fiecare latură. Sînt foarte bune şi unele strecurători de ceai.



Scanned with OKEN Scanner

Masa fecală poate fi împinsă, pentru a trece prin ochiurile sitei mai repede şi mai complet, cu ajutorul „agitatorului lui Thoulet" constituit dintr-o baghetă de sticlă, continuată la unul din capete de un scurt tub de cauciuc, închis la capătul lui terminal cu un dop de plută, al cărui bord superior a fost şlefuit (fig. 2).

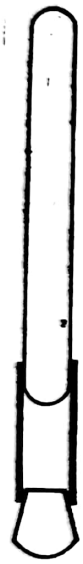


*Fig. 2.* — Agitatorul moale al lui Thoulet.

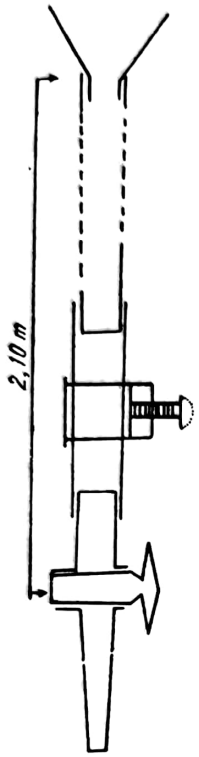



*Fig. 3.* — Aparatul pentru realizarea metodei de sedimentare „Van Somersen", modificată de Grégoire (după Ho Thi Sang).

## Metode fizice de sedimentare

Dintre ele nu vom expune decît pe aceea propusă de Van Someren, modificată de Grégoire şi colab., în 1956 şi menţionată de Ho Thi Sang.

Se ia un tub de sticlă în lungime de 2,10 m. În partea inferioară i se adaptează un tub scurt de cauciuc, închis la mijloc printr-o pensă Mohr. Tubul de cauciuc se termină cu un robinet de sticlă (fig. 3).

Se umple tubul — după ce a fost închis robinetul de sticlă şi a fost deschisă pensa Mohr — cu o soluţie de apă cu Tween 80, în proporţie de 1%. Amestecul se toarnă în tub cu precauţie, pentru a nu se face spumă. Se va umple 1,70 m din tub.

Materiile fecale de examinat se emulsionează într-o soluţie 1% de Tween 80, în proporţie de 1 parte fecale la 9 părţi soluţie, adică 4 g materii fecale la 36 ml soluţie. După o triturare atentă a materiilor fecale — cu grijă ca Tween-ul să nu producă spumă — se tamizează printr-o sită metalică, iar produsul rezultat e vărsat cu atenţie, printr-o pîlnie prevăzută cu un tub de cauciuc, în tubul de sticlă. Elementele figurate cad în lungul tubului cu o viteză proporţională cu densitatea lor. Această metodă nu e potrivită pentru chisturile de protozoare şi nu dă rezultate avantajoase decît pentru ouăle de *Fasciola hepatica*, a căror densitate este de 1,3. Acestea în cursa descendentă reuşesc să ajungă la fundul tubului (deci la robinetul de sticlă) înaintea altor particule existente în masa fecală. Aşteptăm 2 ore. Apoi, pentru a le găsi, închidem



Scanned with OKEN Scanner

întîi pensa Mohr ; deschidem apoi robinetul de sticlă, care va lăsa să curgă într-un mic recipient cîteva picături de lichid — în care se vor afla adunate toate ouăle de *Fasciola* existente în masa de 4 g fecale, de la care am pornit.

## Metode de flotaţie

Elementele parazitare, introduse odată cu masa fecală într-un mediu de o anumită densitate mai mare, se ridică prin flotaţie la suprafaţa acestui mediu, unde se concentrează. Flotaţia se poate realiza liber, într-un timp mai mult sau mai puţin îndelungat, în raport cu densitatea mediului. Ea se poate realiza şi forţat — prin ajutorul centrifugării.

Faust şi Russel, citînd pe Sawitz, dau următoarele densităţi ale elementelor parazitare :

| | |
|---|---|
| ouă de *Ankylostoma* | 1 055 |
| ouă de *Trichocephalus* | 1 150 |
| ouă de *Ascaris* fertile | 1 110 |
| ouă de *Ascaris* nefertile | 1 200 |
| chisturi de *Entamoeba histolytica* | 1 065—1 070 |
| chisturi de *Endolimax nana* | 1 065—1 070 |
| chisturi de *Chilomastix mesnili* | 1 180 |
| chisturi de *Giardia* | 1 060, sau ceva mai puţin. |

**Flotaţia liberă.** Mediul utilizat de cei mai mulţi cercetători pentru flotaţia liberă a elementelor parazitare este soluţia saturată de clorură de sodiu. Are densitatea în jur de 1 200 (în raport cu temperatura, care poate duce la o concentrare deosebită). Pentru prepararea ei se introduce într-un balon de 2 litri 1 litru de apă şi o cantitate în exces de clorură de sodiu (500 g). Se pune balonul la fiert. La temperatura fierberii întreaga cantitate de sare se va topi. La răcire, însă, excesul se depune. Se decantează lichidul, care reprezintă o soluţie de sare saturată. După M. Langeron, soluţia de clorură de sodiu a fost prima oară utilizată, pentru flotarea ouălor de helminţi, de către Bass, în 1906. Metoda a fost reluată şi simplificată în 1918 de Kofoid şi Barber şi perfecţionată în 1920 de Fülleborn.

**Executarea metodei de flotaţie în soluţie saturată de clorură de sodiu.** Rezultatele cele mai bune ale metodei se obţin atunci cînd materiile fecale au fost în prealabil disociate şi suspendate în puţin lichid (ser fiziologic sau apă de robinet), în borcănaşe mici de sticlă, cu gît larg şi dop şlefuit, folosind pentru disociere



Scanned with OKEN Scanner

perle de sticlă. Apoi suspensia concentrată obținută va fi supusă tamizării prin site metalice, pentru înlăturarea particulelor grosolane. În sfîrșit, va fi spălată cu apă sau ser fiziologic, prin cîteva centrifugări, pentru a o debarasa de particulele extrem de ușoare care ar întuneca, în parte, cîmpul microscopic.

Sedimentul de la ultima centrifugare se trece cu puțină apă în recipiente de tipul capacelor de cilindru Borrel, construite din sticlă sau din material plastic. Se amestecă bine la început, cu foarte puțină soluție saturată de clorură de sodiu. Apoi se adaugă și restul de soluție de clorură de sodiu, pînă la umplerea, aproape pînă sus, a recipientului.

**Metoda simplificată.** Atunci însă cînd laboratorul este aglomerat cu multe analize și nu dispune de materialul menționat (borcănașe cu dop șlefuit, perle de sticlă, site de sîrmă, tuburi de centrifugă și, mai mult încă, nu dispune de timpul necesar pentru toate aceste operațiuni), ne putem lipsi de procedura arătată mai sus, dar, firește, cu obținerea de preparate mai puțin reușite, dar valabile. Se poate introduce direct, fără de disociere și tamizare prealabilă, în recipiente de tipul capacelor de cilindre Borrel, o cantitate de materii fecale, de mărimea a două alune. Ele se sfarmă și se amestecă cu o cantitate mică de soluție saturată de clorură de sodiu, cu ajutorul unei baghete de sticlă. Se adaugă apoi restul de soluție salină saturată, pînă la umplerea aproape completă a recipientului.

Se realizează astfel, într-un singur timp, direct în recipientul de flotație, amestecarea materiilor fecale cu soluția salină. Mai multe particule fecale mari se ridică aproape numaidecît la suprafață. Ele se culeg cu o lingură de sticlă sau de metal, sau cu o ansă de sîrmă și se aruncă, întrucît ar îngreuia găsirea elementelor parazitare care vor continua să se ridice după aceea în decurs de 45 min. Elementele parazitare vor fi căutate după acest timp în pătura cea mai superficială a lichidului.

Culegerea elementelor parazitare ridicate la suprafață se poate face în două moduri, net deosebite, din care unul e cunoscut, în genere, sub numele de procedeul Fülleborn, iar celălalt, de procedeul Willis.

**Procedeul Fülleborn.** După cum s-a văzut mai sus, Bass arătase mai demult utilizarea flotării ouălor de paraziți intestinali într-o soluție saturată de clorură de sodiu. Metoda Bass a fost simplificată ulterior de către Kofoid și Barber (1918). Aceștia din urmă amestecau o parte de materii fecale cu două părți de soluție saturată de clorură de sodiu și interpuneau niște site metalice în drumul ascendent al elementelor parazitare. Fülleborn e acela care



Scanned with OKEN Scanner

în 1920 a perfecţionat metoda, punînd douăzeci de părţi soluţie salină, la o parte de materii fecale şi suprimînd sitele, care nu se dovediseră a fi utile ci, mai degrabă, prejudiciabile rezultatelor.

În ceea ce priveşte culegerea elementelor parazitare ridicate la suprafaţă, Fülleborn a continuat să practice metoda folosită şi de Kofoid şi Barber, a utilizării unei anse de sîrmă, asemănătoare cu o ansă bacteriologică, mai largă şi îndoită în unghi drept pe tija ei (fig. 4). Procedeul de culegere a elementelor parazitare cu ansa e utilizat şi astăzi în numeroase laboratoare. Ansa trebuie să formeze un cerc cît mai perfect cu putinţă şi să aibă un diametru de 6—10 mm. Ea nu trebuie cufundată în lichid, ci prelevarea se face exact la suprafaţa lichidului salin. Se captează astfel pelicula de la suprafaţă, conţinînd elementele parazitare, care se depun pe o lamă de microscopie direct sau, mai bine, într-o picătură de lichid (apă, ser fiziologic sau soluţie lugol).

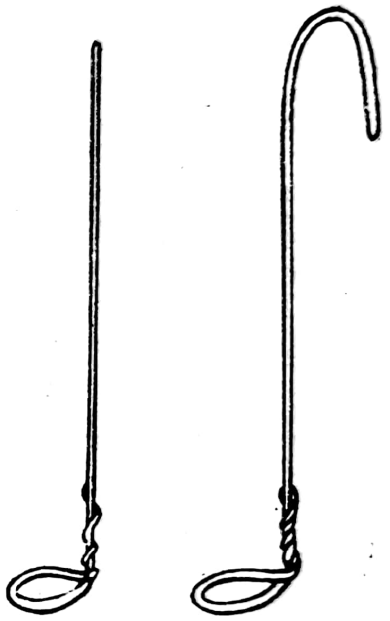


*Fig. 4.* — **Ansa de sîrmă pentru recoltarea elementelor parazitare ridicate la suprafaţa lichidelor mai dense (după Antipin şi colab.).**

**Procedeul Willis.** Această autoare a preconizat un alt procedeu de culegere a elementelor parazitare, şi anume acela de a folosi capacitatea lor de a adera la o suprafaţă de sticlă. Pentru aceasta, Willis propune ridicarea nivelului soluţiei saline pînă la gura recipientului, căreia trebuie să îi formeze un menisc convex. O lamă de sticlă, foarte bine curăţată, rade acest menisc, acoperind recipientul în aşa fel ca nici o bulă de aer să nu rămînă între lama de sticlă şi lichidul din recipient. Elementele parazitare ridicate la suprafaţă vor lua contact cu lama de sticlă şi vor adera la ea. După aşteptarea trecerii timpului necesar urcării şi aderării lor (între 30 şi 45 de min.), lama se ridică şi se întoarce brusc, în aşa fel ca faţa ei, care era în jos, să fie întoarsă în sus. Lichidul rămas pe această faţă se acoperă cu una sau cu mai multe lamele, constituindu-se astfel unul sau mai multe preparate, care vor fi observate la microscop.

Aşadar, cînd menţionăm pe un buletin de analiză că s-a utilizat metoda Willis, este vorba nu numai de utilizarea flotaţiei în soluţia salină ci, mai mult decît atît, de utilizarea capacităţii elementelor parazitare de a adera la sticlă, adică de realizarea procedeului preconizat de Willis pentru captarea elementelor parazitare.



Scanned with OKEN Scanner

Expresia „metoda Willis“ nu poate și nu trebuie considerată ca sinonimă cu „flotația în soluția de clorură de sodiu“. Tot așa credem că ar trebui să dispară de pe buletinele de analiză expresia, care se mai întîlnește uneori, de „metoda Willis-Fülleborn“. Ambii acești autori au folosit flotația elementelor parazitare în soluția saturată de clorură de sodiu. Dar ei nu au în comun decît acest fapt. Culegerea elementelor parazitare ridicate în soluția salină a fost făcută în mod deosebit de acești doi autori și, precizînd numele metodei utilizate, este bine să avem în vedere metoda în întregime, deci tocmai această deosebire. Vom menționa în consecință „metoda Fülleborn“, atunci cînd am cules elementele parazitare cu ansa, și „metoda Willis“, atunci cînd am cules elementele parazitare după procedeul cu lama, preconizat de Willis și expus mai sus.

**Metoda Willis-Hung.** Procedeul preconizat de Willis nu este de recomandat. El provoacă murdărirea mesei de lucru cu soluție salină, în momentul în care radem meniscul acesteia cu lama de sticlă. Pe de altă parte, deschiderea recipientului, prea mare pentru o lamă de microscopie, ne silește a utiliza lame de sticlă provenind din vechi clișee fotografice. Acoperirea lor numai parțial cu lamela lasă suprafețe întinse — care au venit în contact cu lichidul salin — neacoperite de lamelă. Soluția salină se evaporă repede pe această suprafață și dă lamei un aspect din cele mai urîte.

Iată de ce — încă din 1937 — unul din noi a propus pentru procedeul Willis, ca o perfecționare a acestuia, înlocuirea lamelelor de sticlă cu lamele de microscopie — așa cum ele fuseseră utilizate de către Hung în 1926 la Hamburg — într-o metodă proprie de *numărare* a ouălor de helminți. În felul acesta, metoda devine „Willis-Hung“, dar nu mai este concepută ca o metodă de numărare a ouălor de helminți, așa cum fusese ea concepută de Hung și cum o citează Langeron în manualul său de coprologie din 1942 (pag. 904, în notă), ci ca o simplă metodă calitativă, care remediază cu succes defectele practice ale metodei originale Willis. Acest nume de „Willis-Hung“ e corect. El a fost adoptat și figurează azi în multe lucrări privitoare la analizele coproparazitologice.

Metoda se execută practic în felul următor : soluția de clorură de sodiu umple pe trei sferturi recipientul. Cu precauție, se aplică pe suprafața lichidului o lamelă de microscopie 18×18, pe care o ținem paralelă cu suprafața lichidului, între ramurile unei pense mari anatomice, și o lăsăm să cadă pe această suprafață, desfăcînd cele 2 ramuri ale pensei. Lamela rămîne plutind pe suprafața lichi-



Scanned with OKEN Scanner

dului. Într-un recipient ceva mai încăpător pot fi depuse, în acelaşi mod, 2 asemenea lamele, pe care le vom ridica la intervale de timp deosebite, atunci cînd avem îndoieli asupra timpului celui mai just de ridicare.

Lamela se ridică tot cu pensa anatomică, avînd grijă a o menţine tot timpul în poziţia sa primitivă orizontală. O picătură din lichidul salin va rămîne atîrnată de faţa ei inferioară.

Lamela va fi depusă în aceeaşi poziţie pe o lamă de microscopie, incluzînd astfel acea picătură între lamă şi lamelă (fig. 5).

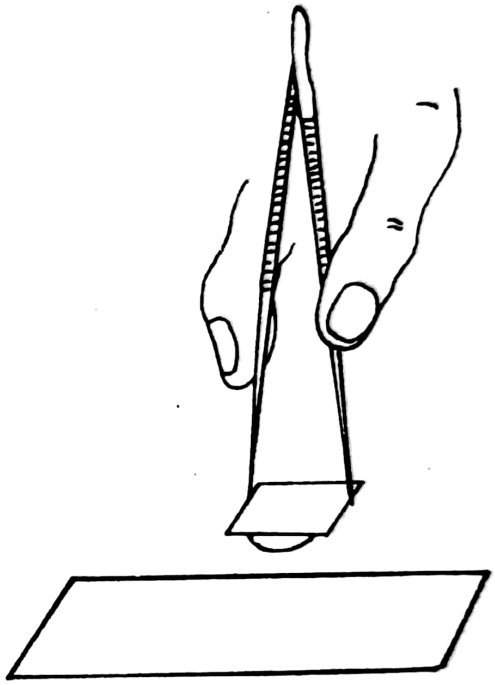


*Fig. 5.* — Menţinerea lamelei între ramurile unei pense anatomice în metoda Willis-Hung.

Punctul principal în executarea metodelor de coproanaliză prin flotaţie e stabilirea momentului celui mai avantajos la care trebuie căutate elementele parazitare ridicate la suprafaţă. Acest timp e în funcţie şi de înălţimea coloanei lichide. Pe de altă parte, însă, elementele odată ridicate nu rămîn la suprafaţă un timp indefinit. Ele se îmbibă cu soluţia densă, se îngreuiază şi cad din nou la fund. Pentru recipientele de tipul capacului de pahar Borrel, socotim că cel mai avantajos moment în care elementele parazitare au reuşit să se ridice în număr suficient de mare şi nu au început încă să cadă la fund e de 45 de min., în flotarea liberă în soluţia saturată de clorură de sodiu.

Această metodă e foarte bună pentru găsirea ouălor uşoare şi, în special, a ouălor de *Hymenolepis nana*, de Ankylostoma şi de oxiuri. E ceva mai puţin adecvată pentru ouăle mai grele, ca cele de tricocefal, dar poate ridica o bună parte şi din acestea. Nu este indicată pentru ouăle nefertile de ascarizi, a căror densitate — după cum am văzut — poate întrece pe aceea a soluţiei saline. Nu este, de asemenea, indicată pentru ouăle operculate — cum sînt majoritatea ouălor de trematode şi ouăle de botriocefalide — şi mai puţin încă pentru ouăle de *Fasciola hepatica*, care nu numai că sînt operculate dar au şi o densitate de 1,3. Chisturile de Giardia — deşi uşoare — se ridică în general în număr mic în soluţia saturată de clorură de sodiu.



Scanned with OKEN Scanner

Căutînd o perfecţionare a metodei de flotaţie liberă, mulţi autori s-au adresat altor soluţii, decît aceleia cu clorură de sodiu. Au fost încercate sulfatul de magneziu, clorura de amoniu, zahărul, hiposulfitul de sodiu şi altele.

M. P. Bolotov a încercat o ridicare a densităţii soluţiei saturate de clorură de sodiu, adăugîndu-i 40% zahăr. Greutatea specifică a soluţiei se ridică astfel de la 1 200 la 1 280. Autorul arată că în această soluţie zaharo-sărată se urcă mult mai bine la suprafaţă ouăle de *Trichocephalus*, ouăle nefertile de *Ascaris* precum şi ouăle de *Taenia*. Kalanterion recomandă utilizarea unei soluţii saturate de azotat de sodiu, a cărei densitate e de 1,37—1,40, ceea ce permite ridicarea şi a ouălor de *Fasciola hepatica*.

**Metoda Otto, Hewitt şi Strahan.** G. F. Otto, R. Hewitt şi D. E. Strahan, inspirîndu-se de la metoda de flotaţie forţată prin centrifugare a lui E. C. Faust (pe care o vom descrie mai jos), utilizează ca lichid dens — ca şi acest autor — sulfatul de zinc în concentraţie de 331 g‰, avînd densitatea de 1,180. Spre deosebire de metoda Faust, flotaţia se face liber, fără centrifugare. Elementele parazitare urcă la suprafaţă în 20—30 de minute.

**Metoda Kuznetzov.** V. G. Kuznetzov propune utilizarea unei soluţii în care intră cîte 100 g clorură de sodiu, hiposulfit de sodiu şi sulfat de magneziu, toate în 300 ml apă. Densitatea ei specifică e de 1,33—1,34. O cantitate de aproximativ 0,5 g de materii fecale se pune într-un borcănaş de sticlă. Se triturează cu o cantitate mică din soluţia salină de mai sus, după care se adaugă restul de soluţie salină, pînă la marginea superioară a borcănaşului. Dacă s-au ridicat la suprafaţă particule grosolane, ele se îndepărtează cu un beţişor sau cu o ansă de sîrmă îndoită în unghi drept pe tija ei. Cum borcănaşele sînt mici (se recomandă flacoane de penicilină, cărora li s-a tăiat partea superioară), nu intră în ele mai mult de 3,5—4 ml soluţie salină.

Se lasă în repaus o oră, după care borcănaşul se pune ca atare sub obiectivul microscopului şi se examinează pelicula superioară. Aşadar, se suprimă manopera culegerii de elemente parazitare (cu ansa sau cu lamela) şi punerea acestor elemente pe o lamă de microscopie — ceea ce realizează o mare economie de material şi de timp.

În cazurile în care pe fundul borcănaşului se formează un sediment compact — care ar împiedica trecerea razelor luminoase — se poate decanta după 30 de minute partea lichidă a suspensiei, într-un alt borcănaş curat, asemănător, adăugîndu-se încă o cantitate



Scanned with OKEN Scanner

de soluţie salină, pentru ridicarea nivelului lichidului pînă sus, şi se aşteaptă încă 30 de min. pentru examinarea la microscop a peliculei superficiale. Densitatea mare a lichidului determină ridicarea la suprafaţă chiar şi a ouălor mai grele, ca ouăle de *Ascaris* nefecundate şi chiar ouăle de *Fasciola hepatica*. P. X. Levina (1970) a înlocuit soluţia lui Kuznetzov cu soluţia saturată de azotat de sodiu a lui Kalanterian. Ea găseşte că această din urmă soluţie ridică

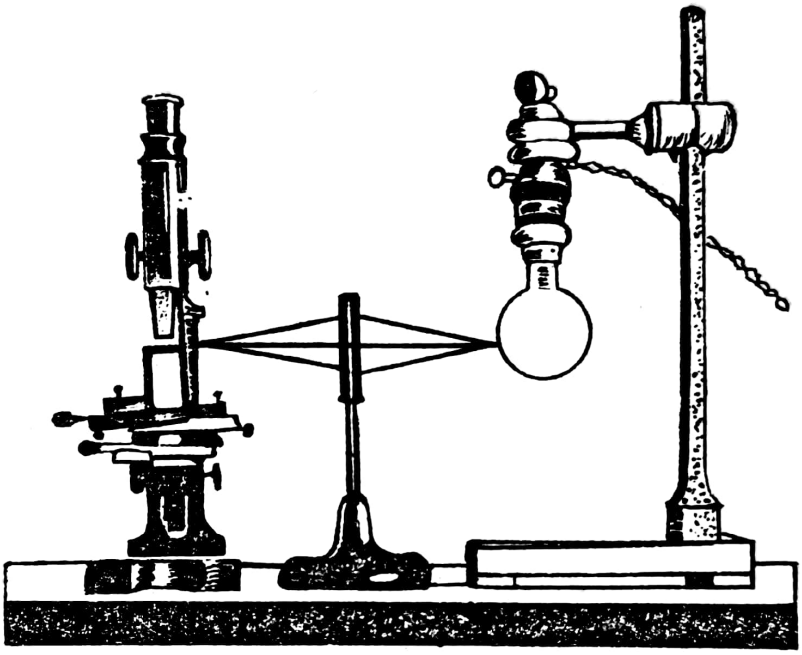


*Fig. 6.* — Metoda A. N. Blajin.

ouăle mai repede şi este în special avantajoasă pentru ridicarea ouălor de *Trichocephalus*.

Metoda de mai sus este denumită de autorul ei „metoda preparatului peliculă". Această metodă reprezintă o perfecţionare a unei metode mai vechi (A. N. Blajin, 1931), în care ouăle ridicate la suprafaţă într-o soluţie saturată de clorură de sodiu, ca în metoda Fülleborn, erau făcute vizibile direct la microscop prin aşezarea paharului sub obiectiv şi iluminarea ouălor printr-un fascicul lateral de lumină, care cade tangenţial cu suprafaţa lichidului, realizînd o iluminare laterală, ca în iluminarea pe fond negru (fig. 6).

**Metoda Simonovici şi Tiapkina.** E. N. Simonovici şi N. P. Tiapkina propun o metodă de flotaţie direct pe lamă. Ei procedează astfel :

1. pe o lamă de microscopie, al cărei cîmp median a fost în prealabil zgîriat în diverse sensuri, pentru a-l face să devină mai



Scanned with OKEN Scanner

rugos, se trag, cu un creion de ceară, două linii transversale, la o distanţă de cîte 1 cm de fiecare capăt al lamei. S-ar putea — credem noi — la fel şi încă şi mai bine, ca aceste linii să fie trase cu parafină topită, folosind o pipetă Pasteur ;

2. pe regiunea rugoasă a sticlei se pune o cantitate mică de materii fecale, la care se adaugă cîteva picături dintr-o soluţie saturată de azotat de sodiu. Lama se ţine în mînă, între indexul şi policele mîinii stîngi. Se amestecă bine masa fecală cu soluţia, cu ajutorul unei lopăţele sau al unei baghete de sticlă. Se veghează ca emulsia făcută să nu treacă peste cele două linii transversale. Particulele grosolane din materii se aruncă, curăţindu-se lopăţica de marginea sticlei ;

3. după ce s-a omogenizat emulsia, lama se aşază pe 2 vergele de sticlă, deasupra unei chiuvete, şi se adaugă, cu o pipetă cu capişon de cauciuc (ca acelea de pus picături), din soluţia de azotat de sodiu, o cantitate suficientă pentru a acoperi întreaga suprafaţă dintre cele 2 linii transversale. Lichidul va bomba sub forma unui menisc convex ;

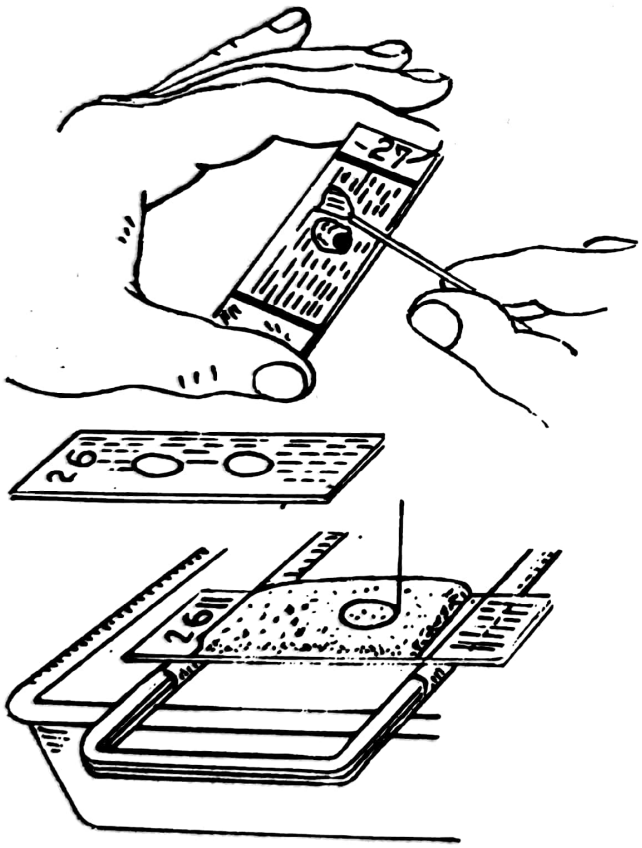



*Fig. 7.* — Metoda Simonovici şi Tiapkina.

4. se aşteaptă 5—6 min., în care timp elementele parazitare se urcă la suprafaţa meniscului. Ele se extrag cu o ansă de sîrmă cu diametrul de 12—13 mm ;

5. pelicula superficială a lichidului, extrasă cu ansa de sîrmă, se depune pe o lamă de microscopie. Se repetă de 8 ori operaţia extragerii cu ansa şi se culege astfel o cantitate de lichid sufi cient pentru a forma una sau două picături ;

6. se aşteaptă 1—1½ min. şi se priveşte picătura la microscop, punînd la punct imaginea suprafeţei picăturii, unde se găsesc ridicate elementele parazitare. Nu e necesară utilizarea de lamele (fig. 7).

Kuznetzov obiectează acestei metode raportul nesatisfăcător între masa fecală cercetată şi masa lichidă densă, raport de natură



Scanned with OKEN Scanner

să ducă la diluarea soluţiei saline şi la scăderea consecutivă a densităţii sale specifice. Pe de altă parte, operaţiile făcute pe lamă ar lăsa de dorit din punctul de vedere al curăţeniei lucrului.

## Metode de flotaţie forţată prin centrifugare

**Metoda Faust cu sulfat de zinc.** După diluarea şi strecurarea materialului fecal, acesta e supus la o triplă spălare, care se realizează, fie cu apă de robinet, fie cu ser fiziologic. Spălarea se efectuează prin 3 centrifugări succesive. După fiecare centrifugare — la 1 500—2 000 de ture — care durează cîte 2—3 min., se aruncă lichidul supernatant şi sedimentul rămas se amestecă cu o nouă cantitate de lichid (apă sau ser fiziologic). Spălarea se face pînă cînd lichidul supernatant rămîne clar. Abia acum turnăm peste sediment o cantitate redusă de soluţie de sulfat de zinc, care se prepară punînd 331 g sulfat de zinc în 1 000 ml apă distilată. Se suspendă sedimentul în această soluţie, după care tubul de centrifugă se umple aproape complet cu soluţia de sulfat de zinc. Se centrifughează din nou 1 min., la 1 500—2 000 de ture. În felul acesta se realizează o flotaţie rapidă a elementelor parazitare, flotaţie care nu mai este liberă, ci forţată, ca un efect al centrifugării.

Concentraţia de 33% a sulfatului de zinc dă lichidului densitatea de 1,180, densitate foarte apropiată de aceea a soluţiei saturate de clorură de sodiu. F. Triozon a încercat să mărească concentraţia soluţiei de sulfat de zinc pînă la 60%, ajungînd astfel la o densitate de 1,300, dar o atare soluţie produce deformări ale unor elemente parazitare. Şi J. P. Raynaud a încercat, cu rezultate dezamăgitoare, ridicarea densităţii soluţiei de sulfat de zinc la 1,44.

Pentru culegerea elementelor parazitare ridicate în pătura superioară a soluţiei se poate utiliza, fie ansa de sîrmă, ca în procedeul utilizat de Fülleborn, dar se poate efectua şi aderarea particulelor parazitare de o suprafaţă de sticlă. Pentru aceasta, cu o pipetă Pasteur se toarnă încet, cu precauţie, ţinînd pipeta în contact cu partea superioară a feţei interne a tubului de centrifugă, o cantitate din soluţia de sulfat de zinc 33%, atîta cît să determine ridicarea lichidului pînă la umplerea completă a tubului, căruia îi formează un menisc convex. Langeron recomandă atingerea meniscului cu o lamă de microscopie — fără a atinge cu lama marginea superioară a tubului. Pelicula superficială cu elementele parazitare aderă în totalitate de lamă. Aceasta se întoarce cu pelicula pe care a captat-o în sus şi se acoperă cu o lamelă. Se poate face



Scanned with OKEN Scanner

şi altfel, şi anume : se pune peste acest menisc o lamelă care se sprijină pe bordul superior al tubului, ca în procedeul Willis. Se aşteaptă cîteva minute şi lamela se ridică şi se aşază pe o lamă de microscopie, ca şi în metoda Willis-Hung. Preparaţii deosebit de frumoase de chisturi de protozoare se obţin dacă în prealabil s-a pus pe lamă o picătură de lugol dublu sau, mai bine încă, de soluţie iodo-iodurată d'Antoni sau Gradwohl. Iodul pătrunde în chisturi şi scoate foarte bine în evidenţă nucleele lor. În general cîmpul e foarte curat şi elementele parazitare se găsesc şi se observă cu uşurinţă. Metoda Faust este excelentă pentru evidenţierea chisturilor de *Giardia* şi de *Amoebidae,* precum şi pentru oochisturile de coccidii. Ca şi metoda cu ClNa, nu dă rezultate mulţumitoare pentru ouăle de trematode şi de botriocefal, şi, mai ales, pentru ouăle foarte grele, ca acelea de *Fasciola hepatica.*

Metoda originală Faust este susceptibilă de a fi simplificată prin suprimarea centrifugărilor prealabile destinate debarasării materiilor fecale de o parte din conţinutul lor (timpul de spălare cu apă), dar rezultatele obţinute sînt tot pe atît de sensibil mai puţin frumoase.

**Metoda Darling.** Se face o diluţie a materiilor fecale cu apă de robinet, pînă la obţinerea unei consistenţe semilichide.

Se centrifughează această diluţie şi se aruncă supernatantul.

Se acoperă sedimentul cu un amestesc în părţi egale de soluţie saturată de clorură de sodiu şi glicerină. Se omogenizează sedimentul în soluţia de mai sus, cu ajutorul unei baghete de sticlă, şi se centrifughează din nou.

Se culege cu o ansă din sîrmă, îndoită în unghi drept pe tija ei, pelicula superficială, care se pune pe lamă şi se observă la microscop.

**Metoda Scerbovici.** Mergînd pe aceleaşi principii şi acelaşi mod de a proceda, Scerbovici propune ca lichid de flotaţie, fie o soluţie saturată cu hiposulfit de sodiu, fie o soluţie saturată de sulfat de magneziu, pentru flotaţia unor ouă mai grele, provenind de la diverse parazitoze ale animalelor domestice. Soluţia saturată de hiposulfit de sodiu necesită 175 g hiposulfit la 100 g apă, iar soluţia saturată de sulfat de magneziu necesită 92 g din această sare la 100 g apă (D. N. Antipin şi colab., 1959).

**Metoda Janeckso-Urbanyi** este tot o metodă de flotaţie prin centrifugare. Ea utilizează ca mediu dens iodomercuratul de potasiu. Soluţia de iodomercurat se prepară în felul următor : se dizolvă 74 g de iodură de potasiu într-o cantitate foarte mică de apă. În această soluţie se introduc pe încetul şi sub agitaţie continuă



Scanned with OKEN Scanner

100 g de biiodură de mercur. Se completează această dublă soluţie cu apă pînă la cantitatea de 265 ml apă (Bailenger). Soluţia se conservă cel puţin 2 luni. Ea are densitatea specifică 1,44. Pentru a se conserva mai mult, Bailenger recomandă păstrarea soluţiei într-o formă mai concentrată, adică :

| | |
|---|---|
| Biiodură de mercur . . . . . | 100 g |
| Iodură de potasiu . . . . . | 74 g |
| Apă . . . . . | 50 g |

În momentul utilizării, Bailenger recomandă a se dilua 10 ml din această soluţie concentrată cu 24 ml apă distilată.

Metoda Janeckso-Urbanyi se execută astfel :

— se suspendă 4—5 g de materii fecale în 20 ml din reactiv ;

— se tamizează prin sită metalică şi se centrifughează materialul tamizat 3 min., la 2 500 de ture ;

— se culeg din pătura superficială elementele parazitare ridicate prin centrifugare ;

— culegerea se face de preferinţă cu o linguriţă sau cu o spatulă de sticlă.

Metoda Janeckso-Urbanyi e foarte preţuită de unii autori occidentali. Ea a fost integrată recent şi de Junod în două metode complexe de analiză coproparazitologică. Socotim ca dăunătoare utilizarea ei. Aşa cum arată şi Bailenger, şi Ho Thi Sang — şi cum am putut să ne convingem prin propria noastră experienţă — iodomercuratul de kaliu are o acţiune caustică şi toxicoalergică care ne sileşte să lucrăm sub protecţia mănuşilor de cauciuc. J. P. Raynaud cere şi ochelari de protecţie. Alterează metalele, sifonul de plumb de scurgere a chiuvetei de apă, tuburile de aluminiu ale centrifugii. Deformează unele ouă de paraziţi, care devin mai greu de recunoscut. Preţul de cost al fiecărei analize e foarte ridicat. Ho Thi Sang arată în plus că scaunele de fermentaţie sînt cu totul improprii pentru a fi prelucrate prin această metodă. Socotim că poate fi înlocuită printr-o altă metodă, care să utilizeze un lichid la fel de dens cum ar fi azotatul de sodiu din metoda Kalanterian. Densitatea soluţiilor este aproape aceeaşi, de 1,37—1,40. După J. P. Raynaud iodomercuratul de potasiu face să dispară unele debriuri pe care alte lichide, de aceeaşi densitate, le ridică la suprafaţă, îngreuind citirea rezultatelor. Cu tot acest important avantaj ne menţinem la părerea că trebuie renunţat la un lichid aşa de vătămător.



Scanned with OKEN Scanner

## Metode combinate: flotaţie şi sedimentare forţate prin centrifugare

**Metoda Bass pentru ouă de helminţi.** Se pare că Bass este cel dintîi autor care a făcut apel la clorura de sodiu pentru analiza coproparazitologică (M. Langeron). Ulterior, el a înlocuit clorura de sodiu cu clorura de calciu. Metoda Bass originală se realizează astfel :

1. diluţia de materii fecale, tamizată, se spală de mai multe ori prin centrifugări repetate ;

2. după ultima centrifugare de spălare se pune peste sediment o soluţie concentrată de sare de bucătărie şi se centrifughează ;

3. ouăle de helminţi se găsesc acum în pătura superioară a lichidului ; se trece această pătură într-o eprubetă de centrifugă şi se diluează cu apă distilată ; se centrifughează din nou ; ouăle de helminţi se găsesc concentrate în sediment.

Am avut ocazia să executăm metoda Bass de mai multe ori, totdeauna cu rezultate foarte mulţumitoare. Ea poate fi simplificată prin suprimarea centrifugărilor de spălare, precum şi a centrifugării soluţiei de clorură de sodiu. Se poate proceda astfel :

Cinci mililitri de diluţie fecală vor fi introduşi într-un pahar Berzelius, de o capacitate redusă, care se umple apoi cu soluţie saturată de clorură de sodiu şi se aşteaptă pînă la o oră. Apoi prin ciocul paharului Berzelius se toarnă cu uşurinţă pătura superioară a soluţiei — în care se găsesc atît ouăle de la suprafaţă, cît şi o parte din acelea care, în mişcarea lor, nu au ajuns încă la suprafaţă, dar sînt foarte aproape de ea — cît şi ouăle care, ridicate mai demult, au început să se îngreuieze şi să cadă puţin, despărţindu-se astfel de suprafaţă.

Cei cîţiva centimetri de lichid salin sînt culeşi într-un tub de centrifugă şi diluaţi cu de 3—4 ori pe atîta apă distilată. O centrifugare — singura pe care o cerem — va concentra ouăle în sediment. Metoda astfel simplificată ne-a dat aceleaşi bune rezultate şi socotim că merită a fi introdusă ca o metodă de rutină pentru cazurile cu număr restrîns de paraziţi care necesită deci o concentrare cît mai eficientă.

**Metoda Bidegaray pentru chisturile de protozoare.** În această metodă se obţine întîi, ca şi în metoda Bass, o flotaţie în lichid dens prin centrifugare şi apoi, tot prin centrifugare, o sedimentare în lichid foarte diluat.

Metoda se execută în modul următor :

1. se diluează materiile în apă sau în ser fiziologic şi se lasă un timp scurt pentru sedimentarea particulelor grosolane şi mari. Se decantează şi se utilizează suspensia supernatantă debarasată



Scanned with OKEN Scanner

de asemenea particule. Se pot la fel tamiza materiile printr-o sită metalică cu ochiuri mici ;

2. suspensia se centrifughează ;

3. se aruncă supernatantul şi se înlocuieşte cu o soluţie de zahăr 20% ;

4. se centrifughează din nou ; chisturile se urcă la suprafaţă ;

5. se culege pătura de la suprafaţă cu o pipetă sau prin vărsare directă într-un nou tub de centrifugă ; această cantitate mică de lichid se diluează cu de 4 ori aceeaşi cantitate de apă distilată ; lichidul îşi pierde prin aceasta densitatea iniţială ;

6. se centrifughează din nou şi chisturile, care se găsesc acum într-un lichid de o densitate mult mai redusă, sînt concentrate la fundul tubului ;

7. chisturile pot fi culese cu o pipetă şi puse între lamă şi lamelă, într-o picătură de lugol dublu, pentru determinare. Ele pot fi şi cultivate, după ce prin mai multe centrifugări cu apă sau ser fiziologic sînt debarasate de zahăr.

## Metode difazice

Să trecem acum la metodele difazice. Cea mai veche dintre ele, metoda Telemann, a fost considerată de inventatorul ei — şi de majoritatea cercetătorilor care au practicat-o — ca o metodă chimică. Se opuneau în această veche concepţie metodele fizice (hidrostatice) de tipul Kefoid şi Barber, Fülleborn sau Willis-Hung cu metodele chimice, al căror prototip era metoda Telemann. În această metodă acţionează asupra materiilor fecale două substanţe chimice. Pe de o parte un acid puternic, care e acidul clorhidric, iar pe de altă parte, eterul sulfuric. Fiecare din ele distruge şi solubilizează anumite elemente figurate, realizînd în chipul acesta o diminuare a elementelor figurate din masa fecală şi inclusiv o concentrare a elementelor parazitare pe unitatea de volum. Acidul clorhidric era considerat că dizolvă săpunurile, fosfaţii, carbonaţii, sărurile de calciu, mucina, unele albuminoide. Eterul dizolvă acizii graşi şi grăsimile neutre (Langeron şi Rondeau du Noyer).

Metoda Telemann originală, publicată în 1908, se practica în felul următor :

— se punea o cantitate mică de materii fecale într-un amestec în părţi egale de acid clorhidric concentrat şi de eter sulfuric ;

— se agita energic pentru emulsionarea materiilor în acest amestec ;



Scanned with OKEN Scanner

— se strecura emulsia printr-o sită, pentru a fi eliminate particulele mai mari, care rămăseseră neatacate de amestec ;

— se centrifuga lichidul strecurat şi se obţineau 3 pături : deasupra eterul, care conţinea grăsimile solvite, la mijloc acidul, conţinînd săruri solvite ; la fund, un sediment de particule mai grele, nesolvite de acid, şi în care se găseau şi elementele parazitare. Dar acestea erau alterate uneori foarte serios, din cauza acţiunii acidului concentrat. Se pierdea, spre exemplu, membrana albuminoidă a ouălor de ascarizi, se deschidea căpăcelul ouălor de botriocefal, se deformau unele ouă mari cu coaja subţire, ca acelea de *Fasciola hepatica*, iar acele cu coaja groasă, ca ouăle de tricocefal, căpătau plesnituri ale cojii în jurul mameloanelor.

Devenea necesară o scădere a puterii acidului clorhidric, ceea ce a realizat Miyagawa în 1913. El a utilizat un acid clorhidric diluat de 2 sau chiar de 3 ori cu apă. Acidul nu mai era amestecat de la început cu eterul, ci era introdus în reacţie singur. Se agita flaconul. Pentru a se compensa scăderea acţiunii acidului realizată prin diluare, suspensia acidă putea fi supusă unei încălziri uşoare. După ce acidul acţionase singur asupra masei fecale se adăuga eterul sulfuric, în aceeaşi cantitate cu a acidului sau în cantitate ceva mai mare. Sedimentul e cu atît mai mic, cu cît cantitatea de eter e mai mare (Miyagawa). Se agită din nou bine flaconul — cu precauţie — ţinînd dopul bine apăsat cu degetul — şi se filtrează conţinutul său printr-o sită de sîrmă sau de ţesut vegetal. Se centrifughează filtratul şi se obţin, de data aceasta, 4 straturi bine distincte : deasupra eterul, căruia îi urmează un inel constituit din detritusuri fine, foarte uşoare, care au fost antrenate spre pătura eterică, dar nu au fost dizolvate de aceasta ; urmează apoi pătura acidă, cea mai bine reprezentată şi în sfîrşit, sedimentul în care vom căuta elementele parazitare.

Metoda Miyagawa a fost perfecţionată în continuare de către M. Langeron, care procedează mai întîi la diluarea cu ser fiziologic şi tamizarea printr-o sită de sîrmă a masei fecale. Diluarea se face într-un borcănaş de sticlă cu gîtul larg şi dop şlefuit, prevăzut cu cîteva perle de sticlă. Borcănaşul se agită bine. Diluţia strecurată e tratată întîi cu acid clorhidric diluat 50% cu apă. (Pentru diluare se toarnă cu încetul acidul în apă şi nu apa în acid.) Cantitatea de acid diluat va fi numai pe jumătate faţă de masa diluată de materii fecale, ceea ce realizează o diluare şi mai mare a acestuia. După agitare şi un repaus de cîteva minute, se adaugă eterul sulfuric în cantitate egală cu aceea a diluţiei de materii fecale, plus diluţia de acid.



Scanned with OKEN Scanner

Se agită din nou, cu multă prudenţă, ţinînd bine apăsat cu degetul dopul flaconului, pentru a preveni ţîşnirea în afară a unei porţiuni din lichid. Se centrifughează şi se obţin aceleaşi 4 pături arătate mai sus.

Continuînd cercetările sale în vederea perfecţionării metodei Telemann, M. Langeron a cerut ulterior reducerea la jumătate a cantităţii de eter.

Pentru examinarea sedimentului trebuie vărsate mai întîi celelalte 3 pături care îl acoperă. Pentru aceasta începem prin a dezlipi de pereţii interiori ai tubului de centrifugă inelul de detritusuri fine, care de obicei aderă la sticlă. Operaţia se face cu uşurinţă, cu o efilură de pipetă Pasteur, pe care o introducem în tub — vertical — lipită de peretele interior al acestuia, şi o plimbăm în această poziţie verticală, de jur-împrejurul inelului aderent. După dezlipirea inelului de detritusuri se întoarce tubul cu capul în jos, deasupra unei chiuvete. Întoarcerea se face cu o mişcare rapidă. Cele 3 pături se scurg în chiuvetă. Sedimentul rămîne, aderînd de fundul tubului.

Înainte de a întoarce tubul în poziţie normală, ştergem cu un tampon de tifon sau de vată pereţii săi interiori, pentru a evita ca unele resturi de pe pereţi să se scurgă în sediment şi să-l îngroaşe cu substanţe inutile.

Cu o pipetă Pasteur se ia din sediment una sau două picături care se trec pe o lamă, se acoperă cu o lamelă şi se examinează la microscop.

**Metoda Telemann-Rivas.** Metoda Telemann, modificată de Langeron, a suferit ulterior modificări cu mult mai importante. Dintre acestea vom cita întîi pe aceea introdusă în 1928 de către Damaso de Rivas. Acesta a înlocuit acidul clorhidric cu acid acetic diluat 5% (cinci ml soluţie acidă pentru fiecare gram de materii fecale); eterul se adaugă în aceeaşi cantitate cu acidul.

Primul avantaj al acestei metode este claritatea cîmpului microscopic obţinut. În al doilea rînd metoda Rivas este mai puţin vătămătoare, întrucît acidul acetic este pe de o parte, mai slab ca acidul clorhidric, iar pe de alta, se găseşte într-o diluţie mai mare (1/20). Chisturile de amibe — cu excepţia aceluia de *Entamoeba coli* — prezintă o decolare a protoplasmei de pe membrana chistică (Yves Golvan).

**Metoda Carles şi Barthelmy.** Ca dată este anterioară metodei Rivas. Ea introduce un element nou, acela al fixării materialului prin formol, iar în ceea ce priveşte acidul, înlocuieşte acidul clorhidric tot printr-un acid cu mult mai slab, şi anume cu acidul citric. Metoda se realizează în doi timpi. Primul timp e acela al



Scanned with OKEN Scanner

fixării. Scaunele (1—2 g) sînt diluate de 10 ori într-o soluţie de ser fiziologic formolat după formula :

| | |
|---|---|
| Clorură de sodiu . . . . . | 9 g |
| Formol din comerţ . . . . . | 100 ml |
| Apă q.s.p. . . . . | 1 000 ml |

Suspensia diluată e tamizată după fixare printr-o sită de sîrmă şi centrifugată un minut. Sedimentul acestei centrifugări este supus în un al doilea timp acţiunii acidului citric şi a eterului. În soluţia de acid citric se introduce formol, după formula :

| | |
|---|---|
| Acid citric . . . . . | 12 g |
| Formol din comerţ . . . . . | 2 ml |
| Apă q.s.p. . . . . | 100 ml |

Deci o soluţie de acid citric 12%, în care intră formol 2%.

După acţiunea acidului citric se adaugă o cantitate egală de eter sulfuric şi se centrifughează. Sedimentul e fin şi clar. Chisturile de protozoare îşi pierd refringenţa, dar nucleele lor apar clar (Ho Thi Sang).

**Metoda Ritchie.** Acest autor foloseşte formolul în locul acidului clorhidric. În metoda sa iniţială materiile fecale trebuiau spălate în prealabil cu ser fiziologic, prin centrifugări repetate, pînă ce supernatantul rămînea limpede.

Sedimentul ultimei centrifugări se acoperă cu cîţiva mililitri dintr-o soluţie de formol din comerţ, diluată de 10 ori cu apă distilată. Se lasă să acţioneze formolul 5 min. Se adaugă apoi eterul în aceeaşi cantitate. Se agită puternic şi se centrifughează.

Metoda poate fi simplificată prin suprimarea centrifugărilor de spălare. Se pot pune direct scaunele în soluţia de formol 10%. Se agită puternic. Se tamizează şi se adaugă un volum egal de eter.

Ulterior Ritchie (1960) reduce diluţia formolului la numai 7,5%, în loc de 10%, şi reduce, de asemenea, cantitatea de eter la 3 ml, pentru 10 ml suspensie fecală.

Ceea ce Ritchie aduce nou în 1960 este şi încercarea de tamponare a suspensiei formolate la anumite pH-uri şi anume la pH = 4, pH = 7 şi pH = 10. Or, rezultatele obţinute în ce priveşte numărul elementelor parazitare e în funcţie de acest pH. Ritchie găseşte, spre exemplu, că ouăle de *Ascaris* apar mai numeroase la pH = 10, decît la pH = 4, pe cîtă vreme ouăle de *Ankylostoma*, dimpotrivă, se găsesc în cantitate mai mare la pH = 4, decît la pH = 10. Tricocefalul nu e influenţat de pH. Pentru chis-



Scanned with OKEN Scanner

turile de protozoare, în cercetările lui Ritchie pH-ul cel mai favorabil e acela de 7. În consecinţă, fiecare element parazitar îşi are pretenţiile sale în ceea ce priveşte pH-ul la care se execută reacţia. Iată în tabelul I, după Ritchie, procentajul infecţiilor parazitare diagnosticate, în funcţie de pH-ul reacţiei :

*Tabelu II*

| Paraziţii | pH | | |
|---|---|---|---|
| | 4 | 7 | 10 |
| *Ascaris* | 84 | 98 | 98 |
| *Ankylostoma* | 98 | 94 | 41 |
| *Trichocephalus* | 100 | 100 | 100 |
| *Schistosoma japonicum* | 20 | 55 | 78 |

Pe de altă parte, numărul de ouă găsite în probele pozitive era la fel, în funcţie de pH-ul respectiv. Astfel pentru *Ascaris* media de ouă găsite la 50 de probe pozitive la pH = 4, 7 şi 10 era respectiv 7, 20 şi 60, adică într-o variaţie aproximativă de 1 : 3 : 9.

La *Ankylostoma* numărul de ouă a fost, la aceleaşi pH-uri, de 25, 25 şi respectiv 1.

Un al doilea fapt pe care-l discută Ritchie e rolul alcoolului ca diminuant al greutăţii specifice a mediului. Dacă soluţia capătă, graţie alcoolului, o densitate specifică mai mică, rezultatele determinate de pH-uri variate pot fi modificate. Aşa, spre exemplu ascaridul, care într-un mediu fără alcool ieşea mai bine la pH = 10, în soluţiile cu alcool iese mai bine la pH = 7. Tricocefalul, care în soluţia de formol tamponată nu era influenţat de pH, devine sensibil la pH în soluţiile cu densitatea specifică scăzută prin alcool. În asemenea soluţie numărul de ouă în sediment creşte la pH = 7 şi pH = 4. El scade la pH = 10.

Problema influenţei pH-ului a fost reluată curînd după aceea de către Bailenger (1963), care formulează o nouă concepţie asupra analizelor coproparazitologice de tipul reacţiei Telemann.

**Concepţia Bailenger.** Potrivit acestei noi concepţii acţiunii chimice şi dizolvante a acidului şi eterului în reacţia Telemann şi în celelalte reacţii de acelaşi tip derivate din ea, i s-a acordat o importanţă pe care nu o merită.

Toate aceste reacţii etichetate drept „chimice" folosesc două lichide puse în prezenţă, dar nemiscibile, două faze contrarii. Una din ele este faza apoasă, cealaltă este faza eterată. Acest fapt determină, pentru fiecare particulă figurată din masa fecală, realizarea unui coeficient de partaj condiţionat de balanţa hidrofilă-



Scanned with OKEN Scanner

lipofilă. Dacă balanţa înclină către faza apoasă, elementul respectiv va trece în faza apoasă şi se va găsi pînă la urmă prezent în sediment. Dacă înclină către faza eterată, elementul respectiv va fi atras către eter, care formează pătura superioară la centrifugare, pătura în care nu poate totuşi pătrunde. El se va găsi la limita inferioară a ei, în acel inel socotit înainte ca alcătuit exclusiv din detritusuri mărunte şi foarte uşoare, dar care poate conţine şi elemente mai mari şi chiar ouă de helminţi.

Aşadar, fără a nega putinţa acidului de a dizolva unele particule figurate din materiile fecale, nu acesta e mecanismul care condiţionează rezultatele reacţiilor de tipul Telemann, ci cu totul altul şi anume partajul între cele 2 faze nemiscibile. Asemenea metode trebuie denumite *difazice*. Această nouă concepţie şi denumirea de „metode difazice" au căpătat adeziunea majorităţii cercetătorilor.

Or, cel mai de seamă factor care activează asupra balanţei hidrofile-lipofile e tocmai pH-ul fazei apoase. De acest pH atîrnă trecerea sau nu în faza apoasă, şi deci în sediment, a fiecărui element parazitar şi ca atare valoarea mai mare sau mai mică a reacţiei.

Bailenger confirmă atît principiul, cît şi sensul în care se exercită influenţa pH-ului arătată de Ritchie. Ca şi acesta, el găseşte, spre exemplu, că ouăle de ascarid au nevoie de un pH ridicat, cele de *Ankylostoma* de un pH coborît, pe cînd ouăle de tricocefal sînt indiferente faţă cu pH-ul fazei apoase. Bailenger găseşte în concluzie că pH-ul apare ca unul din factorii fundamentali ai concentrării ouălor de helminţi în metodele difazice. Şi în ceea ce priveşte găsirea în sediment a chisturilor de protozoare pH-ul are un interes primordial. Potrivit cercetărilor acestui autor, pH-urile sub 4 sînt în general defavorabile concentrării chisturilor de entamibe *(E. coli, E. histolytica, E. hartmanni)*. Cele mai favorabile pH-uri pentru aceste chisturi sînt între 4 şi 6. El arată mai departe că pH-ul influenţează atît structura, cît şi refringenţa chisturilor. Pentru entamibe, citoplasma granulară pînă la pH = 2 devine hialină peste această valoare. Refringenţa se estompează treptat şi după pH = 6 citoplasma tinde să se decoleze de pe peretele înconjurător şi să se retracte în jurul nucleelor. Pentru chisturile de *Giardia* pH-ul cel mai favorabil este 4. Sub această valoare se văd nucleele, dar nu se văd bine flagelii. Aceştia dispar progresiv peste pH = 6, în timp ce chisturile devin hialine şi refringenţa lor se atenuează. Aşadar, şi pentru chisturile de *Giardia* limitele cele mai favorabile ale pH-ului se găsesc între 4 şi 6.



Scanned with OKEN Scanner

**Natura ionilor.** Dar dacă pH-ul e unul dintre factorii care influenţează balanţa hidrofilă-lipofilă a elementelor parazitare, el nu este singurul factor capabil a o influenţa, ci trebuie să ţinem seama, ca de-al doilea factor important, de natura ionilor celor două faze şi, în primul rînd a fazei apoase. Pentru a dovedi importanţa compoziţiei ionice a fazei apoase, Bailenger a întreprins cercetări comparative cu trei lichide de compoziţii ionice deosebite — toate însă tamponate la acelaşi pH — care din cercetările anterioare i se arătase ca cel mai favorabil pentru majoritatea elementelor parazitare, şi anume pH = 5. Aceste lichide sînt :

1. tamponul acetoacetic, pe care-l notează în tabelul de mai jos (tabelul II) cu AA ;
2. tamponul bromosuccinic, pe care-l notează cu BS ;
3. tamponul citrofosforic, pe care-l notează cu CP.

*Tabelul II*

| Paraziţii | Nr. de scaune examinate | Nr. de cazuri diagnosticate | | | Nr. de elemente parazitare pe fiecare caz (în medie) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | AA | BS | CP | AA | BS | CP |
| *Schistosoma mansoni* | 2 | 2 | 2 | 2 | 43 | 12 | 8 |
| *Trichocephalus* | 11 | 11 | 11 | 11 | 30 | 21 | 30 |
| *Ankylostoma* | 9 | 9 | 9 | 9 | 57 | 31 | 37 |
| *Ascaris* | 8 | 8 | 8 | 8 | 133 | 88 | 64 |
| *Taenia* | 1 | 1 | 1 | 1 | 8 | 15 | 15 |
| *Fasciola* | 1 | 1 | 1 | 1 | 5 | 10 | 8 |
| *Dicrocoelium* | 6 | 6 | 6 | 6 | 27 | 13 | 18 |

Rezultă din tabelul de mai sus că în prezenţa aceluiaşi pH faza apoasă care s-a arătat cea mai favorabilă e aceea acetoacetică. Deşi pentru toţi aceşti paraziţi s-a putut pune diagnosticul în toate cazurile, totuşi numărul mediu de elemente găsite pentru fiecare din aceste faze apoase nu e identic. Cu mult mai favorabile pentru toţi paraziţii cercetaţi s-a arătat a fi tamponul acetoacetic, cu excepţia teniei şi a fasciolei hepatice, în care tamponul bromosuccinic a dat rezultate mai bune. Compoziţia lichidului acetoacetic a fost următoarea :

| | |
|---|---|
| Acetat de sodiu cristalizat . . . | 15 g |
| Acid acetic cristalizat . . . . . | 3,60 ml |
| Apă distilată q.s.p. . . . . | 1 000 ml |

Se ajustează la pH = 5, cu acid acetic.

În ceea ce priveşte chisturile de protozoare, compoziţia ionică deosebită a fazei apoase nu a influenţat concentrarea lor, dar struc-



Scanned with OKEN Scanner

turile intrachistice (nuclee, flageli) apar mai bine tot cu tamponul acetoacetic.

Bailenger atrage atenţia asupra interdependenţei dintre cei 2 factori : pH-ul şi compoziţia ionică. Rezultatele de mai sus — zice el — sînt valabile numai pentru pH = 5. Ele ar putea fi deosebite la un alt pH.

Ce se poate spune despre compoziţia fazei eterice ? Şi pentru această fază au fost făcute propuneri de modificare, adăugîndu-se la eter toluol, xilol, oxid de butil sau acetat de butil, alcool metilic, propilic, butilic şi alcool amilic, în proporţii variabile. Aceste adaosuri s-au dovedit în mod special defavorabile pentru concentrarea chisturilor de protozoare, şi trebuie abandonate. O observaţie particulară face Bailenger cu privire la alcoolul etilic. După cum am arătat mai sus, Ritchie, introducînd în reacţie alcool etilic, socotea că favorizează depunerea ouălor de helminţi prin scăderea densităţii lichidului. Or, Bailenger nu e de acord cu această interpretare. Potrivit concepţiei sale, alcoolul modifică compoziţia ionică. El introduce grupe hidrofile în eter şi grupe lipofile în apă. La un acelaşi pH modificările produse atîrnă — spune Bailenger — de rezultanta care se dezvoltă între atracţia exercitată de către acei OH introduşi în faza eteroalcoolică şi atracţia acelor $C_2H_5$ introduşi în faza hidroalcoolică. Dacă această rezultantă e dirijată către pătura eteroalcoolică, paraziţii vor fi mai puţin abundenţi în sediment. Dacă dimpotrivă, rezultanta e dirijată către pătura hidroalcoolică, concentraţia elementelor parazitare va creşte.

**Detergenţii.** O a treia influenţă care poate modifica rezultatele unei reacţii difazice poate fi exercitată de unele substanţe tensioactive (detergenţi). Ele pot modifica structura particulelor din masa fecală şi, implicit, echilibrul hidrofil-lipofil (Bailenger). Există detergenţi anionici, cationici şi neionizabili. Ei pot influenţa nu numai elementele parazitare căutate (chisturi de protozoare şi ouă de helminţi), dar şi alte mici elemente, ca unii microbi, care pot fi antrenaţi în număr mai mare în sediment, ceea ce poate produce greutăţi la observarea celor dintîi.

Pentru a verifica influenţa eventuală a detergenţilor asupra elementelor parazitare, Bailenger efectuează paralel 4 ordine de cercetări asupra unei aceleiaşi mase fecale omogenizate utilizînd următoarea fază apoasă :

1. tampon acetoacetic la pH = 5 ;
2. tampon acetoacetic la pH = 5 plus 1‰ tinovetină (detergent neionizabil) ;
3. tampon acetoacetic la pH = 5 plus 1‰ laurilsulfonat de sodiu (detergent anionic) ;



Scanned with OKEN Scanner

4. tampon acetoacetic pH = 5 plus 1‰ Bradosol Ciba (detergent cationic).

După adăugarea de eter se centrifughează şi se obţin rezultatele redate în tabelul III.

*Tabelul III*

| Paraziţii | Nr. de probe de fecale examinate | Nr. de cazuri diagnosticate | | | | Nr. mediu de elemente pe caz diagnosticat | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | AA | Tv | Ls | Brd | AA | Tv | Ls | Brd |
| *Acaris* | 10 | 10 | 10 | 10 | 7 | 30 | 34 | 42 | 12 |
| *Taenia* | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 5 | 6 | 184 | 81 |
| *Ankylostoma* | 10 | 10 | 9 | 10 | 9 | 32 | 14 | 11 | 17 |
| *Fasciola* | 11 | 6 | 6 | 11 | 9 | 2 | 3 | 11 | 10 |
| *Schistosoma mansoni* | 4 | 2 | 2 | 4 | 2 | 44 | 10 | 80 | 41 |
| *Dicrocoelium* | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 12 | 27 | 10 | 24 |
| *Trichocephalus* | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 75 | 51 | 64 | 75 |

Din nou Bailenger avertizează că rezultatele de mai sus nu trebuie considerate ca valabile decît în condiţiile prezentei experienţe, adică la pH = 5.

În general, rezultatele cele mai bune le-a dat laurilsulfonatul de sodiu care, dacă ne referim în special la ouăle de tenie, a dat rezultate deosebit de interesante. Dar sînt şi paraziţi care au fost mai favorabil influenţaţi de alţi detergenţi, spre exemplu *Dicrocoelium,* de către tinovetină. În ce priveşte tricocefalul, detergenţii nu s-au arătat de folos. Cu bradosolul se ajunge abia la ceea ce se ajungea fără detergenţi — iar atît laurilsulfonatul de sodiu, cît şi tinovetina dau rezultate inferioare. Concluzia acestor experienţe este aceea că fiecare din elementele parazitare poate beneficia doar de anumiţi detergenţi şi că trebuie încă realizate multe cercetări pentru a ne da seama de intimitatea proceselor care se petrec.

**Metoda coproparazitologică Bailenger.** Ţinînd seama de toate datele de mai sus, Bailenger recomandă următoarea metodă :

— se suspendă 2—3 g de materii fecale într-o cantitate de 10 ori mai mare din soluţia :

| | |
|---|---|
| Acetat de sodiu cristalizat . . . | 15 g |
| Acid acetic . . . . . | 3,60 ml |
| Apă distilată q.s.p. . . . . | 1 000 ml |

— acest lichid a fost în prealabil ajustat la pH = 5, cu ajutorul acidului acetic. Se lasă suspensia de materii diluate să sedimenteze într-un pahar conic timp de cel mult 1 min. ;



Scanned with OKEN Scanner

— se decantează într-un tub de centrifugă o parte din supernatant,

— se adaugă aceeaşi cantitate de eter sulfuric şi se agită viguros,

— se centrifughează la 1 500—2 500 de turaţii pe min., între 1 şi 3 min.

Se examinează sedimentul, după vărsarea păturilor superioare.

**Metoda Faust şi Ingalls.** Această metodă utilizează ca fază apoasă sulfatul de sodiu, căruia i se adaugă o picătură dintr-o soluţie concentrată de Triton NE.

Faza apoasă : soluţie apoasă de sulfat de sodiu 10—12%.

La 5 ml se adaugă o picătură de soluţie concentrată de Triton NE (detergent neionizabil).

Se introduce 1 g de materii fecale în 5 ml din soluţia de mai sus. Se tamizează şi se adaugă peste masa tamizată 5 ml eter sulfuric ; se centrifughează 1 min. la 1 500 de ture.

Această metodă a fost considerată de Beaver ca metodă de elecţie pentru găsirea cristalelor Charcot-Leyden care, potrivit părerii acestui autor, fiind solubile în soluţiile acide, nu pot apărea în reacţiile difazice cu faza apoasă acidă. Am avut ocazia să ne convingem de avantajele metodei Faust-Ingalls în ceea ce priveşte găsirea cristalelor Charcot-Leyden, dar aceste avantaje le punem nu pe seama lipsei de aciditate a reactivului Faust şi Ingalls, ci pe faptul că formaţiile cristaloide căutate au o hidrofilie mărită la un pH mai ridicat. Or, pH-ul soluţiei utilizate de Faust şi Ingalls e de 6. Găsirea cristalelor Charcot-Leyden cu metoda de mai sus se încadrează deci în concepţia Bailenger. Avantajele metodei nu ţin nici de adaosul de Triton. Lucrînd cu soluţie tampon Britton-Robinson, am constatat că cel mai potrivit pH pentru aceste cristale e între 6 şi 8 — chiar în lipsă de Triton sau de alt detergent.

**Metoda Blagg, Schloegel, Manson şi Khalaf sau metoda TIFC.** S-a arătat mai sus metoda de fixare şi colorare rapidă a elementelor parazitare (în special valabilă pentru protozoare, chisturi şi forme vegetative) cu ajutorul mertiolatului de sodiu, a iodului, a formolului şi a eozinei. Această metodă se mai numea MIF sau, mai recent, TIF (vezi pag. 17—19).

Or, acelaşi lichid TIF poate fi utilizat şi într-o metodă de concentrare în felul următor :

— se prepară soluţia fixatoare (pag. 17) şi se introduc în aceasta într-o proporţie de 10 ori mai mică, materiile fecale ; fiecare gram şi jumătate în 15 ml. Se triturează bine, pentru obţinerea unei suspensii cît mai fine. Se varsă totul într-un pahar conic, pentru un minut, în care timp porţiunile grosolane cad la



Scanned with OKEN Scanner

fund şi se trece partea superioară a suspensiei într-un tub de centrifugă. Se adaugă 4 ml eter sulfuric la 10 ml suspensie, se acoperă tubul cu un dop de cauciuc şi se agită viguros ;

— se lasă tubul 2 min. în repaus. Dacă emulsia se menţine uniformă în acest timp, tubul se centrifughează. Dacă însă eterul se ridică deasupra, se adaugă încă 1 ml apă de robinet şi se agită din nou. Dacă şi de data aceasta, în 2 min., se ridică din nou eterul la suprafaţă, se adaugă un nou ml de apă şi se continuă la fel, nepunînd tubul la centrifugă (bineînţeles, după ce am scos dopul), decît atunci cînd emulsia rămîne uniformă în cele 2 min. de repaus în care e observată.

După centrifugare se aruncă păturile superioare şi se examinează sedimentul (Ho Thi Sang).

Ho Thi Sang consideră acest din urmă punct ca foarte important. Ea recomandă expres timpul de 2 min. de aşteptare şi repetarea adăugării de 1 ml apă, dacă din nou eterul se va urca la suprafaţă. Această posibilitate a fost prevăzută şi de Blagg şi colab., în articolul lor din 1955. Ei consideră însă că faptul se întîmplă numai cu probele de fecale rău preparate („improperly prepared"), iar rolul adăugării de apă ar fi acela de a creşte greutatea specifică a lichidului. Ei nu pun posibilitatea necesităţii de a repeta, de mai multe ori, adăugarea de apă.

Alţi autori — ca spre exemplu foarte recent Robert Baughn şi Azorides Morales (1971) — nu mai pomenesc la tehnica reacţiei MIFC de această posibilitate a necesităţii adăugării de apă, dar ei lucrează cu scaune proaspete, bine fixate, cu material proaspăt preparat, lăsat în fixator numai o noapte. O altă deosebire o constituie faptul că la prepararea soluţiei de mertiolat s-a pus mai puţină apă distilată. Soluţia cu care au lucrat aceşti autori a fost :

| | |
|---|---|
| Tinctură mertiolat . . . . . | 200 g |
| Formol 40% . . . . . | 25 ml |
| Glicerină . . . . . | 5 ml |
| Apă distilată . . . . . | 200 ml (nu 250) |

**Metoda PAFS.** Materialul fixat cu reactivul PAF poate fi folosit într-o metodă difazică pe care o propune Robert Burrows în 1967. Această metodă se execută astfel :

— se filtrează prin tifon şi se trec într-un tub de centrifugă 10 ml din emulsia de materii fecale fixată în lichidul PAF (vezi pag. 13) ;

— se centrifughează 3 min. la 1 800 de turaţii ;

— se decantează supranatantul şi se spală sedimentul de 3—4 ori cu ser fiziologic 0,85%. Atunci cînd supranatantul rămîne limpede, se decantează şi se pun din nou peste sediment 10 ml soluţie



Scanned with OKEN Scanner

salină 0,85% și o picătură de Triton NE. Se amestecă bine cu o baghetă și se lasă să stea în repaus 10 min. ;

— se adaugă 2 ml eter sulfuric ;

— se astupă cu dop de cauciuc și se agită viguros ;

— se scoate dopul și se centrifughează 3 min., la 2 000 de turații ;

— se aruncă păturile superioare și se șterg bine pereții interiori ai tubului de centrifugă cu un tampon de vată ;

— se pot adăuga peste sediment una sau două picături de apă și se examinează o picătură din sediment la microscop.

După cum se vede, pe cîtă vreme în metoda MIFC faza apoasă era constituită din soluția de mertiolat, la fel cu aceea care servise și ca fixator, în metoda PAFS faza apoasă e reprezentată de simpla soluție de ser fiziologic 0,85%. Burrows arată că a încercat să utilizeze ca fază apoasă fixatorul PAF, dar rezultatele obținute au fost mult mai puțin satisfăcătoare.

R. E. Baughn și Azorides Morales au cercetat valoarea comparativă a metodelor MIFC, PAFS și Ritchie. Or, din 218 probe de materii fecale cu ouă de helminți, rezultatele au arătat că :

— MIFC a detectat ouăle în 82,1% cazuri ;
— PAFS „ „ 72 % „ ;
— Ritchie „ „ 43,1% „ .

În ceea ce privește detectarea infestațiilor cu protozoare, în 92 probe, cifrele au fost :

— MIFC a detectat protozoare în 71,7% cazuri
— PAFS „ „ „ „ 72,8% „
— Ritchie „ „ „ „ 45,7% „

Metoda Ritchie, care le-a dat autorilor de mai sus rezultate așa de puțin încurajatoare, a fost executată de ei astfel :

— după ce emulsia de materii fecale în soluție fiziologică a fost trecută prin tifon și spălată cu ser fiziologic prin centrifugări repetate, s-au adăugat deasupra sedimentului 10 ml formol 10% ;

— s-a amestecat și s-a lăsat în repaus 5 min. ;

— s-au adăugat 3 ml eter, s-a scuturat viguros și s-a centrifugat 2 min., la 1 800 de turații.

**Metoda Engelbrecht.** Acest autor lasă să acționeze asupra materiilor fecale, într-un prim timp, o soluție de pepsină 0,1%. 1 g de materii fecale e introdus în 10 ml soluție pepsină 0,1%.

Se lasă 30 min. la 37°C sau 1 oră la 27°C.

Dacă e nevoie, lichidul se strecoară printr-o sită.

Se adaugă eter sulfuric, în cantitate egală cu soluția de pepsină.

Se amestecă bine prin scuturare.

Se centrifughează 4—5 min., la 2 000 de turații.



Scanned with OKEN Scanner

Se aruncă păturile superioare.

Dacă e nevoie, se adaugă 1—2 picături de apă la sediment.

Se pun pe o lamă 2 picături mari de sediment, care se întind gros, sub forma unui pătrat sau dreptunghi, ca în metoda Kortenhaus.

Se lasă să se usuce preparatul la adăpost de praf.

Se acoperă cu ulei de parafină şi cu o lamelă 22×22 mm şi se examinează la microscop.

Această metodă nu e recomandată decît pentru ouăle de helminţi.

Preparatele se pot păstra mult timp, întrucît uleiul de parafină nici nu se usucă, nici nu cristalizează.

Pentru îndepărtarea uleiului de parafină lamele studiate se introduc în eter.

## Metode combinate

(metode difazice şi metode hidrostatice)

În această categorie vom descrie metoda Thébaut, metoda Gorkina şi metodele Junod.

**Metoda Thébaut.** Se practică astfel : se triturează şi se diluează o probă de 5 g materii fecale cu 50 g din o fază apoasă, avînd compoziţia următoare :

| | |
|---|---|
| Formol din comerţ . . . . . | 10 ml |
| Acid tricloracetic sol. 20% . . . | 1 ml |
| Apă distilată q.s.p. . . . . | 100 ml |

— se tamizează diluţia prin sită metalică sau se varsă suspensia fecală într-un pahar conic şi se lasă 1 min. după care se utilizează porţiunea superioară. În felul acesta ne-am debarasat, prin sedimentare rapidă, de porţiunile mai mari şi grosolane ale suspensiei. Porţiunea decantată e trecută într-o pîlnie de separare de formă oblongă, închisă la partea superioară cu dop de sticlă şlefuit şi continuată la partea inferioară cu un tub prevăzut cu robinet. Pîlnia se umple pe jumătate. Se adaugă acum pentru completarea conţinutului eter sulfuric, pînă aproape de dop. Se pune dopul ;

— se agită puternic, pentru a se obţine o emulsionare cît mai perfectă, şi se lasă pîlnia în repaus. În acest timp eterul se ridică deasupra, antrenînd la limita inferioară de separare de restul lichidului, adică de faza apoasă, un strat de particule fine ;



Scanned with OKEN Scanner

— se scoate dopul pîlniei şi se deschide robinetul de jos, lăsînd să se scurgă astfel faza apoasă pînă la stratul de detritusuri, sub pătura de eter. Această porţiune apoasă se trece într-un tub de centrifugă şi se centrifughează 1 min. la 1 700 de turaţii. Se varsă supernatantul, iar sedimentul este acoperit cu un lichid de densitate ridicată, care are următoarea compoziţie :

| | |
|---|---|
| Bromură de sodiu cristalizată . . . | 69,2 g |
| Apă distilată . . . . . | 100 ml |

— se centrifughează din nou 1 min. În acest timp elementele parazitare de o densitate mai mică urcă la suprafaţă, unde le putem culege şi examina, ca în metodele de flotaţie descrise la capitolul respectiv.

Valentin şi Solle au simplificat metoda Thébaut prin suprimarea flotaţiei în bromura de sodiu. Ei caută elementele parazitare direct în sedimentul primei centrifugări. Pentru aceasta însă e bine să nu supunem la centrifugare lichidul din porţiunea de jos a pîlniei, decît după ce am lăsat să se scurgă din pîlnie, într-un alt recipient, partea cea mai de jos a lichidului, care conţine elementele cele mai grele şi grosolane ale fazei apoase, elemente care ar îngreuia citirea rezultatelor, dacă sînt lăsate să intre în sedimentul de centrifugare şi numai după aceea să culegem restul lichidului pe care îl vom supune la centrifugare (Ho Thi Sang).

Autorii nu sînt în totul de acord cu rezultatele acestei metode. Spre exemplu, pentru Ho Thi Sang ea nu concentrează prea bine chisturile de *Giardia,* pe cînd Golvan o consideră foarte adecvată pentru găsirea acestor chisturi.

**Metoda Gorkina.** 1. O cantitate totală de materii fecale, reprezentînd capacitatea unei linguriţe şi provenind din diferite puncte ale masei fecale, se diluează în raport cu consistenţa, cu o cantitate de 6—10 ml apă de robinet. Se omogenizează cu ajutorul unei baghete de sticlă. Trebuie să se obţină o masă de consistenţă semilichidă, care se tamizează printr-o sită metalică.

2. Produsul tamizat se trece într-o eprubetă şi i se adaugă 1 ml acid clorhidric concentrat şi 1—2 ml eter sulfuric. Se acoperă eprubeta cu un dop de plută şi se aşteaptă 10—15 min. — timp în care, din cînd în cînd, lichidele se amestecă prin răsturnarea eprubetei (atenţie la buna astupare a eprubetei cu dopul de plută).

3. Se centrifughează conţinutul eprubetei 1—2 min., se varsă supranatantul şi se reţine sedimentul.

4. Peste sediment se adaugă 8—10 ml dintr-un amestec în părţi egale de soluţie saturată de clorură de sodiu şi de glicerină.



Scanned with OKEN Scanner

Soluţia trebuie să fi fost bine amestecată înaintea utilizării.

5. Sedimentul cu soluţia de mai sus se amestecă bine, cu ajutorul unei baghete de sticlă, şi se centrifughează din nou 2—3 min., la 2 000—3 000 de turaţii/min.

6. Se culege cu o ansă pelicula ridicată la suprafaţă în urma centrifugării.

Este deci vorba de combinarea unei metode de tip Telemann cu metoda Darling. C. I. Skriabin, în 1946, în cartea sa asupra evoluţiei helmintologiei sovietice, considera metoda Gorkina ca o inovaţie valoroasă pentru diagnosticul helmintiazelor.

**Metoda Junod.** Mult mai recent, în 1966, Junod publică în Buletinul societăţii de patologie exotică din Paris o metodă combinată, pe care i-a sugerat-o metoda Roman din 1957. Junod recomandă de asemenea, utilizarea mai întîi a unei metode difazice, şi alege de preferinţă metoda Carles şi Barthélmy sau metoda Bailenger, dar s-ar putea alege şi o altă metodă.

Sedimentul obţinut prin această metodă difazică e supus mai întîi la o flotaţie grăbită prin centrifugare — într-un lichid de densitate medie — care determină urcarea la suprafaţă a elementelor mai uşoare, şi apoi sedimentul rămas îl supune la o a 2-a flotaţie, la fel grăbită prin centrifugare — într-un lichid de o densitate mai mare. Deci în esenţă e vorba de o metodă difazică şi de 2 flotaţii succesive în lichide de densităţi deosebite.

Iată unele detalii asupra practicării ei :

— pentru metoda difazică Junod recomandă utilizarea unei cantităţi mici de eter şi o agitare „fără exces“ — pentru a obţine în sediment cît mai numeroase elemente parazitare ;

— sedimentul obţinut va fi amestecat întîi cu 2—4 ml soluţie saturată de sulfat de zinc şi centrifugat 30 sec. la viteză mică. Lichidul supernatant — conţinînd elementele care au flotat la densitatea respectivă — e diluat de 3 ori cu apă distilată şi recentrifugat. Din sedimentul obţinut se fac 1—2 preparate microscopice. Se vor obţine aci elementele mai uşoare : chisturi de protozoare, ouă de oxiuri, de *Ankylostoma,* de *Trichocephalus,* larve de *Strongyloides,* unele ouă de *Ascaris* (Junod). Ne întrebăm dacă nu ar fi de preferat o soluţie de sulfat de zinc 33% în locul soluţiei saturate de sulfat de zinc. Ea ridică în măsură suficientă elementele parazitare mai uşoare, nu le alterează şi lasă în sediment debriurile celulozice ;

— sedimentul rămas după centrifugarea cu sulfatul de zinc e supus la o a 2-a flotaţie forţată prin centrifugare, într-o soluţie de iodomercurat de potasiu de densitate 1,6, care se obţine prin diluarea licorii Thoulet, de densitate 3,17. Şi de data aceasta se culege



Scanned with OKEN Scanner

supernatantul, se diluează cu apă distilată și se centrifughează din nou, pentru a obține ouăle grele (*Taenia, Bilharzia, Fasciola,* unele ouă de *Ascaris*).

Metoda este firește, mai lungă și mai greu de executat, prin numeroasele centrifugări pe care le necesită. Pe lîngă aceasta, socotim că ar putea fi evitat iodomercuratul de potasiu — înlocuindu-l cu un alt lichid, cu greutate specifică ridicată, ca spre exemplu nitratul de sodiu.

Iată acum și *metoda Roman* (1957), la care ne-am referit mai sus : sedimentul de centrifugare al unei metode difazice, ca metoda Telemann, e pus în suspensie în 2,5 ml de soluție de sulfat de zinc. Atît Bailenger, cît și Yves Golvan stipulează că e vorba de o soluție de sulfat de zinc 33%. Se centrifughează 1 min., la 1 500 de ture. Debriurile celulozice rămîn în sediment. Se decantează supernatantul, se diluează cu de 3—4 ori aceeași cantitate de apă distilată și se centrifughează din nou 1—2 min., la 1 500 ture. Se examinează sedimentul acestei noi centrifugări.

**A doua metodă complexă preconizată de Junod.** În 1972 Junod preconizează o nouă metodă coproparazitologică, destinată în mod special concentrării de trofozoiți de amibe. El propune să se înceapă cu fixarea trofozoiților de amibe cu următorul lichid :

| | |
|---|---|
| Acetat de sodiu cristalizat . . . . | 15 g |
| Acid acetic . . . . . | 20 ml |
| Aldehidă formică . . . . . | 40 ml |
| Apă distilată q.s.p. . . . . | 1 000 ml |

— se ia o probă de scaun (5—10 g) și se diluează în 30—60 ml ser fiziologic, deci într-o cantitate de 6 ori mai mare de lichid ;

— se centrifughează 2 min., la 2 000 de turații ;

— se aruncă lichidul supernatant și se înlocuiește cu aceeași cantitate din soluția fixatoare de mai sus.

Se centrifughează din nou. (Nu se preconizează timpul necesar unei bune fixații.) ;

— se aruncă supernatantul și se pun peste sediment 4—5 ml dintr-un lichid dens, în care trofozoiții se vor ridica la suprafață. Acest lichid dens va fi iodomercuratul de potasiu de densitatea 1,20. Este vorba de lichidul utilizat în metoda Janeckso-Urbanyi, dar căruia i se scade densitatea de la 1,4 la 1,2, prin adăugare de apă distilată. Junod consideră că acest lichid este singurul care poate fi utilizat cu succes. „Soluțiile dense de altă natură (NaCl, $SO_4Zn$) — zice el — dau rezultate nemulțumitoare pentru ridicarea trofozoiților".

Acest lichid se găsește în Franța în comerț, în soluție concentrată, sub denumirea de „licoarea lui Thoulet", cu o densitate de



Scanned with OKEN Scanner

3,17. Dacă la un volum licoare Thoulet se adaugă 9,85 volume apă distilată se obţine o scădere a densităţii la 1,20 — adică la densitatea necesară pentru prezenta reacţie.

Evident, faptul de a avea iodomercuratul de potasiu gata preparat, fără să mai necesite altceva decît o simplă diluare, reprezintă o uşurare a muncii pentru laboratoare. Lichidul continuă însă să-şi păstreze şi sub această formă calităţile sale corozive şi socotim că ar trebui continuate cercetări în direcţia găsirii unei alte substanţe cu densitatea de 1,20, care să-l poată înlocui în rolul de ridicare a trofozoiţilor de amibe. Pînă atunci însă, metoda trebuie expusă aşa cum a fost concepută de autorul său.

După centrifugarea cu iodomercuratul de potasiu cu densitatea 1,20 se trece supernatantul într-un alt tub de centrifugă, în care i se adaugă 15—20 ml apă distilată, pentru a-i scădea densitatea, şi se supune la o nouă centrifugare. De data aceasta elementele care se ridicaseră la suprafaţă prin iodomercuratul de potasiu vor cădea la fund şi le vom găsi în sedimentul acestei noi centrifugări. Vom găsi aici trofozoiţii de amibe, concentraţi în număr mare şi foarte bine identificabili prin structura lor nucleară, care apare foarte limpede la examenul microscopic. Vom găsi şi chisturi de protozoare, precum şi unele larve şi ouă de helminţi.

*Cercetări complementare.* Sedimentul rămas de la centrifugarea iodomercuratului cu densitatea 1,20 nu se aruncă. El poate fi utilizat, ca şi în prima metodă Junod, pentru a fi supus la o nouă flotaţie cu un lichid de densitate mai mare (1,44). Acesta va fi tot iodomercuratul de potasiu, dar nediluat, care e utilizat în metoda Janeckso-Urbanyi. După centrifugare, supernatantului i se adaugă, la fel şi cît mai rapid, apă distilată, pentru a-i scădea densitatea, şi se centrifughează din nou. Vom găsi în acest nou sediment ouă grele de helminţi : *Fasciola hepatica, Schistosoma,* unele ouă de *Ascaris* şi de *Trichocephalus.*

În sfîrşit, cu sedimentul rămas de la centrifugarea cu iodomercuratul cu densitatea 1,44 se execută acum una din metodele difazice cu eter sulfuric, pentru a se extrage şi ouăle care, aderînd la debriuri grele, nu au avut putinţa de a flota nici în acest de-al doilea lichid dens.

Cu alte cuvinte metoda cea nouă inversează procedura din 1966, începînd cu două flotaţii în lichide de densităţi deosebite şi trecînd, în cel de al treilea timp, la centrifugarea cu eter.

Junod consideră că această metodă complexă dă satisfacţie deplină, permiţîndu-ne să găsim toate elementele parazitare — inclusiv trofozoiţii de amibe — perfect identificabili prin struc-



Scanned with OKEN Scanner

tura nucleilor lor, care rămîn uşor lizibili. Singura obiecţie pe care continuăm a i-o aduce e aceea a corozivităţii iodomercuratului care, socotim noi, ar trebui înlocuit cu o altă substanţă mai puţin vătămătoare pentru cercetător şi pentru instrumentarul de laborator şi care trebuie căutată în continuare.

**Observaţiile lui M. Brassinne şi colab.** Observaţia făcută de Ch. Junod asupra importanţei naturii substanţei care alcătuieşte mediul densificat pentru flotarea elementelor parazitare, şi anume că la o aceeaşi densitate de 1,20 se obţin pentru flotarea trofozoiţilor de amibe rezultatele cele mai bune numai cu iodomercuratul de potasiu, a fost refăcută foarte recent de către M. Brassinne şi colab. (1973), cu privire la alte elemente parazitare supuse la flotaţie în mai multe soluţii. Aceşti autori arată că flotarea forţată prin centrifugarea ouălor de ascarizi şi de strongilide, obţinută cu 3 lichide deosebite — sulfatul de magneziu, clorura de sodiu şi clorura de zinc, aduse la aceeaşi densitate de 1,20 — dă rezultate deosebite în raport cu natura lichidului respectiv. Clorura de zinc dă rezultate net inferioare faţă de celelalte 2 substanţe. Aşadar, nu numai în metodele difazice, dar şi în acelea de flotaţie trebuie ţinut seama de natura ionilor care compun lichidul utilizat.

# Metode speciale pentru concentrarea larvelor de Strongyloides stercoralis

Larvele de *Strongyloides stercoralis*, atunci cînd se găsesc în număr mare, pot fi uşor depistate chiar şi la un examen direct sau prin una din metodele de concentrare descrise mai sus. Atunci cînd însă sînt în număr redus, găsirea lor necesită o metodă de



Scanned with OKEN Scanner

concentrare specială. Există mai multe asemenea metode. Ele se bazează pe higrotropismul larvelor. Cea mai simplă se inspiră din metoda pe care Leichtenstein o elaborase pentru scoaterea larvelor de ankilostomide din materiile fecale. Ea se practică prin mai multe procedee.

**Procedeul Leichtenstein.** Materiile fecale sînt expuse la aer într-o cutie Petri deschisă, pînă la o desicare a păturii superficiale. Apoi sînt acoperite cu apă. Larvele trec repede din masa fecală în apă, prin crusta de desicare, care împiedică amestecul materiilor fecale cu apa. Apa respectivă e trecută într-un tub de centrifugă şi larvele vor fi găsite în sedimentul de centrifugare.

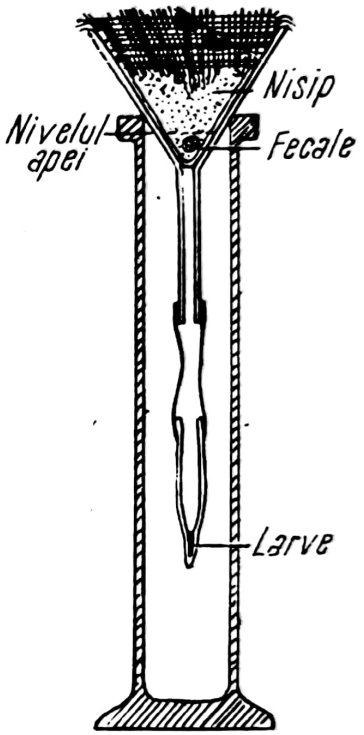


*Fig. 8.* — Procedeul Lee (după M. Langeron).

**Procedeul Kolmer şi Boemer.** Aceşti autori propun ca atunci cînd materiile fecale sînt „mulate", deci posedă o oarecare consistenţă, să se facă în ele o excavaţie care se umple cu apă. Larvele trec în apă. E mai bine a da materiilor fecale o consistenţă mai mare, amestecîndu-le în prealabil cu pulbere de cărbune vegetal. Această metodă a fost perfecţionată de R. Deschiens (1939). În materiile fecale amestecate cu pulbere de cărbune şi aşezate într-o cutie Petri se face o excavaţie conică, care merge pînă la fundul cutiei. În această excavaţie se introduce un con de hîrtie de filtru plisată, care se adaptează şi îmbracă excavaţia practicată. În conul de hîrtie de filtru se pun cîţiva ml de apă. Marginile filtrului depăşesc suprafaţa fecalelor şi se aştern pe această suprafaţă. Larvele trec în apă, fie trecînd peste aceste margini umezite ale conului de hîrtie de filtru, fie străbătînd activ prin hîrtia de filtru care se interpune între masa fecală şi apă. Ele vor putea fi recoltate cu o pipetă.

**Procedeul Lee.** O pîlnie de sticlă este îmbrăcată pe dinăuntru cu o foaie de tifon. Peste tifon se pune o pătură de nisip. Pe nisip se aşază masa fecală, amestecată în prealabil tot cu nisip. Pîlnia se prelungeşte cu un tub de cauciuc, continuat cu o pipetă Pasteur, al cărei vîrf efilat e închis la flacără. Se pune în pîlnie apă pînă ce întreaga masă fecală introdusă e acoperită. Aparatul e introdus într-o etuvă la 37°C şi lăsat o oră şi jumătate. În acest timp larvele din fecale trec în apă şi se îngrămădesc în efilura



Scanned with OKEN Scanner

pipetei Pasteur. Dacă acum se pensează cu o pensă Mohr tubul de cauciuc şi se rupe efilura pipetei vom culege, în puţina apă care se scurge, totalitatea larvelor care se găseau în masa fecală (fig. 8).

**Procedeul Brug.** Se foloseşte un pahar conic cu picior, utilizat în mod obişnuit pentru sedimentări. Se umple acest pahar cu apă. Materiile fecale consistente (dacă nu sînt suficient de consistente se măreşte consistenţa lor cu pulbere de cărbune vegetal) se pun într-un săculeţ din muselină sau alt ţesut subţire şi dens, iar săculeţul, susţinut de o sfoară, se atîrnă aşa fel ca să intre în partea superioară a apei din pahar (fig. 9). Larvele din masa fecală trec

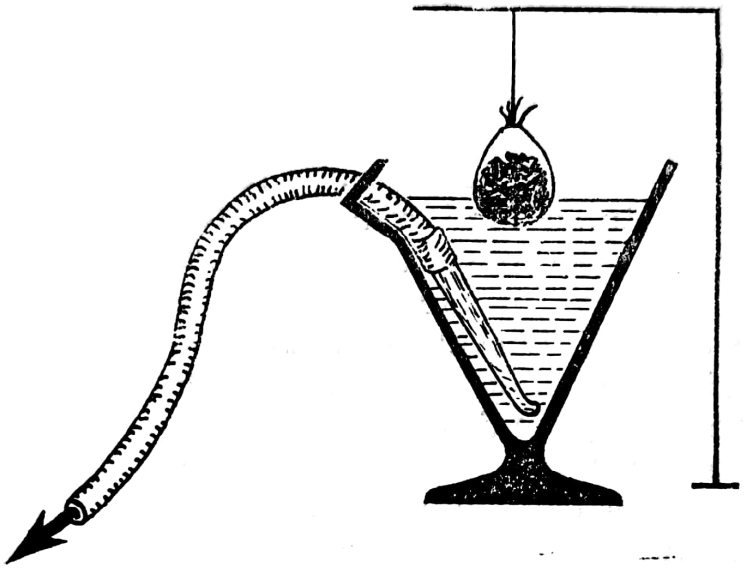


*Fig. 9.* — Procedeul Brug (în parte, după I. Golovan).

prin ţesutul care le împrejmuieşte, cad în apă şi se sedimentează la fundul îngustat al paharului conic, de unde sînt extrase cu o pipetă. Golvan şi Drouhet propun sifonarea păturii superioare de apă printr-un tub introdus pînă aproape de fundul paharului şi racordat la o pompă de vid. În felul acesta pot fi mai cu uşurinţă culese larvele din cei cîţiva ml de apă ce rămîn după sifonare pe fundul paharului conic.

**Procedeul Baermann.** Azi laboratoarele folosesc de preferinţă varianta următoare, care se inspiră din metoda originală prin care Baermann căuta larvele de *Ankylostoma* din pămîntul infestat, metodă pe care o recomandăm şi noi.

Materiile fecale sînt depuse pe o sită metalică cu ochiuri mici, tapisată cu hîrtie subţire, de tipul hîrtiei Joseph sau a hîrtiei subţiri pe care se fac copiile dactilografiate. Sita e introdusă în partea superioară a únei pîlnii de sticlă, pe bordul căreia se reazimă marginile ei. Pîlnia se continuă cu un tub de cauciuc, terminat



Scanned with OKEN Scanner

cu o scurtă pipetă Pasteur. După ce acest tub de cauciuc a fost ocluzionat printr-o pensă Mohr sau Hofman, se pune în pîlnie apă la temperatura de 45°C, pînă la sita cu materiile fecale. Apa trebuie să ajungă şi să depăşească uşor nivelul inferior al masei fecale, fără de a se ridica pînă deasupra ei. Larvele trec în apă şi se adună în tubul de cauciuc. Prin deschiderea pensei ele se vor scurge într-un pahar sau direct într-un tub de centrifugă (fig. 10).

Toma Liviu, într-un studiu amplu asupra strongiloidozei (Teză de doctorat, 1972), recomandă scurgerea celor 5—10 ml apă cu larvele într-o eprubetă care va fi supusă examinării la ankiloscop (acest aparat e descris mai jos, la expunerea metodei Harada Mori).

Ho Thi Sang consideră că metoda Baermann, pentru a reuşi mai bine, trebuie să îndeplinească următoarele condiţii :

1. Scaunele să fie cît mai recente. Ele nu trebuie să fi fost conservate la frigider.

2. Cantitatea de materii fecale să fie de cel puţin 10 g.

3. Temperatura apei să fie de 45°C şi, pe cît posibil, să fie menţinută la acest nivel în tot cursul extracţiei. Acest deziderat a fost realizat la secţia de parazitologie clinică din Bucureşti, prin înconjurarea pîlniei cu un strat de apă pe care o menţinem la 45°C, cu ajutorul unei rezistenţe de frigider introdusă prin intermediul unei teci la adîncimea necesară, precum şi introducerea unui termometru care să controleze temperatura realizată.

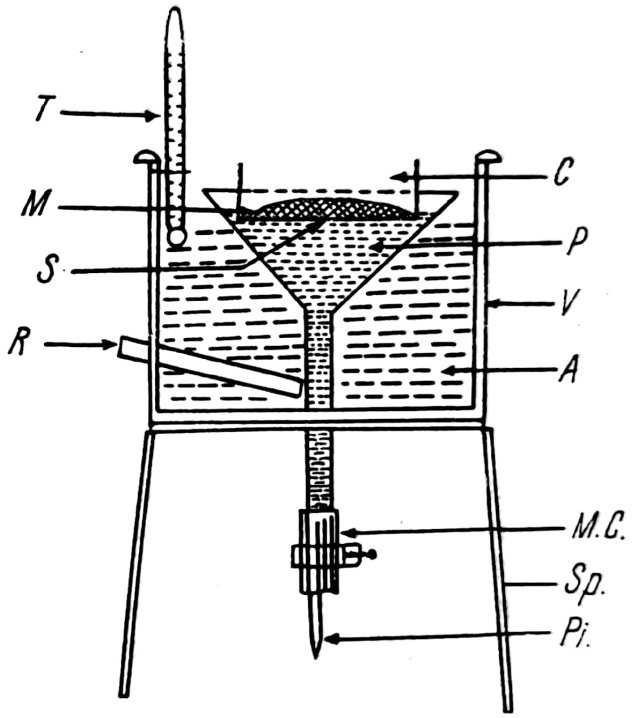



*Fig. 10.* — Aparatul Baermann (modelul realizat de Ghernescu şi introdus de prof. Nitzulescu la Clinica de parazitologie din Bucureşti). *V* — vas de tablă în care pătrunde un tub de tablă *R*, în care se introduce rezistenţa de Fram ; *T* — termometru ; *P* — pîlnie de sticlă ; *M* — materii fecale ; *C* — cutie de tablă al cărui fund e înlocuit de sita *S* ; *A* — apă ; *Mc* — manşon de cauciuc ; *Pi* — pipetă de sticlă ; *Sp* — suport.

4. Timpul de extracţie să fie de cel puţin o oră, dar e preferabil să fie prelungit la 3 ore în cazurile cu larve foarte puţine.



Scanned with OKEN Scanner

**Metoda Ferrioli.** Ferrioli a simplificat metoda Baermann în felul următor : se foloseşte o sticlă de ceas din sticlă Pyrex, cu diametrul de 9 cm şi o adîncime de 0,9 cm. Fundul sticlei de ceas e săpat pe ambele feţe de o uşoară adîncitură cu un diametru de circa 5 cm.

Materiile fecale se depun pe o sită de sîrmă de cupru cu ochiuri foarte mici, montată într-un cerc din acelaşi metal, cu diametrul de 7 cm şi înălţimea de 1 cm. Cercul e prevăzut cu un mîner metalic, prin intermediul căruia să poată fi manipulat. Masa fecală va fi pusă pe această sită pe o suprafaţă de 5 cm diametru.

Sita se aşază pe sticla de ceas.

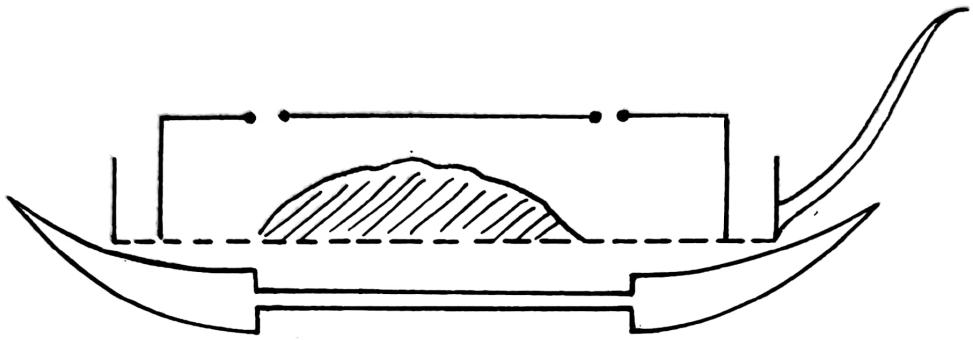


*Fig. 11.* — Aparatul Ferrioli.

Deasupra materiilor fecale se instalează un capac de metal de forma unei jumătăţi de cutie Petri. Capacul are pe fundul său 2 găuri.

În sticla de ceas se introduce apă la temperatura de 45°C, aşa fel ca nivelul apei să atingă faţa inferioară a masei fecale din sita de sîrmă (fig. 11).

Se lasă o oră, după care se retrag capacul şi sita. Larvele trecute între timp în apă vor fi găsite îngrămădite în porţiunea cea mai declivă, adică în centrul sticlei de ceas. Ele se observă foarte uşor sub un binocular.

**Metoda Harada Mori.** Această metodă se găseşte expusă în raportul tehnic O.M.S. nr. 255 din 1963, anexa 3. Potrivit acestui raport, Harada şi colab. au fost cei dintîi care au imaginat utilizarea benzilor de hîrtie de filtru umezite pentru cultura larvelor de ankilostomide. Metoda a fost ulterior pusă la punct de Sasa şi colab. şi apoi de Hsieh. Ea poate fi perfect utilizată şi în simplu scop diagnostic, pentru extragerea larvelor de Strongyloides din masa fecală. Metoda se execută astfel :

— se folosesc eprubete 18 × 180 sau 20 × 200. Pe o bandeletă de hîrtie de filtru, de lăţime potrivită pentru a intra în aceste eprubete, se întind în strat gros materiile fecale de cercetat, dar numai pe porţiunea medie a benzii, lăsînd liberă porţiunea de 5 cm care va ajunge la fundul eprubetei ;



Scanned with OKEN Scanner

— în fundul eprubetei se introduce apă pe o înălţime de 3 cm. Materiile fecale de pe bandeleta de filtru nu vor atinge deci pătura de apă, dar apa suptă de către hîrtie le va umezi în toată porţiunea lor inferioară ;

— eprubeta se închide ermetic la capătul superior cu hîrtie de celofan adezivă (fig. 12).

*Fig. 12.* — Metoda Harada-Mori.

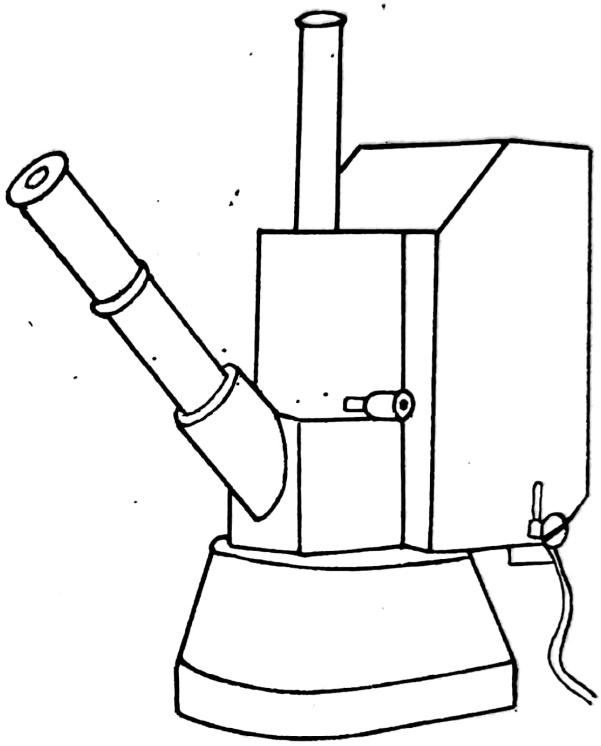


*Fig. 13.* — Ankiloscopul.

Larvele din materii vor migra prin higrotropismul lor în apa din fundul eprubetei. Aci ele vor putea fi observate cu uşurinţă, utilizînd un aparat imaginat de Sasa şi colab. şi denumit ankiloscop (fig. 13). Este constituit dintr-o lentilă montată la capătul unui tub oblic, prin care se poate vedea fundul eprubetei iluminat de un mic bec electric. În lipsa ankiloscopului larvele vor putea fi văzute şi direct, cu o bună lupă de mînă. Ele pot fi culese din fundul eprubetei cu o pipetă şi depuse între lamă şi lamelă, pentru o observare mai atentă şi diferenţierea eventuală de larve de tricostrongili sau de ankilostomide. Pentru grăbirea trecerii larvelor se poate introduce partea inferioară a eprubetei într-o baie marină, la temperatura de 37—45°C. Noi am utilizat în locul eprubetei tuburi de sticlă înalte şi cu fund plat, de care se ser-



Scanned with OKEN Scanner

veşte Industria de medicamente pentru ambalarea unor comprimate, ca, spre exemplu, cele de perogen. Aceste tuburi, la fel dotate cu hîrtie de filtru pe care sînt întinse materiile fecale, sînt aşezate pe o platină Malassez electrică, a cărei lamă superioară e menţinută la temperatura de 40°C.

**Metoda Dăncescu.** Această metodă utilizează higrotropismul larvelor într-un mod cu totul deosebit. Ea se inspiră dintr-o

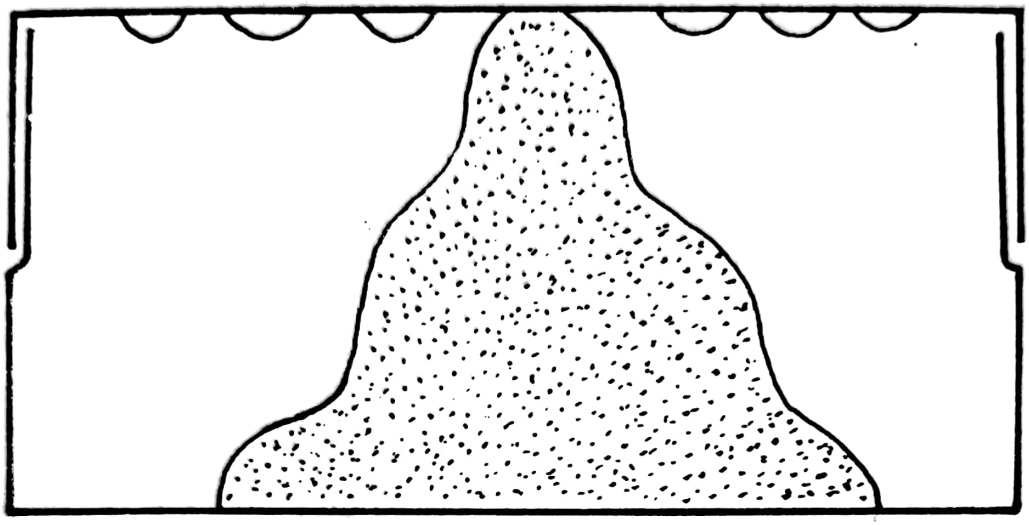


*Fig. 14.* — Metoda Dăncescu. Cutie din material plastic.

metodă de cultură a larvelor de *Strongyloides* în cutii Petri, elaborată de Ho Thi Sang. În acea metodă materiile fecale, amestecate în prealabil cu pulbere de cărbune vegetal şi apă pînă la consistenţa unei paste groase, se introduc într-o cutie Petri, în aşa fel ca să formeze o moviliţă care, prin vîrful ei, să atingă capacul cutiei. Picăturile de apă de condensare care se formează pe capac atrag larvele de *Strongyloides* care, urcîndu-se prin gerotropism negativ în lungul moviliţei ating capacul. Ele pot fi găsite dacă se ridică şi se întoarce capacul şi se observă la binocular acele picături.

Dăncescu a perfecţionat această metodă folosind în locul cutiilor Petri cutii de material plastic transparent, utilizate de industria farmaceutică pentru unele comprimate, ca cele de vitamină B complex, faringosept şi altele. Asemenea cutii se închid foarte bine — capacul fiind perfect ajustat la cutie — şi se suprimă pericolul unei infestări cu larve devenite filariforme în cursul observaţiilor asupra lor. Pe de altă parte, capacul nu se mai întoarce pentru a fi privit prin faţa sa inferioară, ci rămîne pe loc, iar picăturile de condensare sînt privite prin faţa superioară şi suficient de transparentă a capacului. Pentru a se grăbi şi men-



Scanned with OKEN Scanner

ţine picăturile de condensare se recomandă acoperirea cutiilor cu un şervet umed, care răceşte capacul şi-l menţine la o temperatură mai rece decît restul cutiei. Apariţia larvelor se face cu oarecare întîrziere (abia a 2-a sau a 3-a zi ele apar în picăturile de apă). Deci cutiile trebuie menţinute în observaţie zilnică cel puţin 3 zile, dar e preferabil ca observarea lor să se prelungească la 5 zile. După acest termen ele nu vor mai fi recuperate, ci aruncate la crematoriu cu totul, avînd în vedere costul lor redus.

## Metode de îmbogăţire a elementelor parazitare

După cum am arătat şi mai sus, expresia „metode de îmbogăţire" trebuie considerată sinonimă cu „metode de cultivare", metode prin care aducem o multiplicare reală a puţinelor exemplare în care se găseşte reprezentat un anumit parazit. Ele sînt foarte utile pentru un diagnostic corect şi aplicarea lor măreşte, într-un procent mai mult sau mai puţin ridicat, numărul de cazuri pozitive. Aşa, spre exemplu, Reichenow (1923) a reuşit să găsească prin metoda culturilor parazitul *Chilomastix mesnili*, în unele scaune care fuseseră negative la examenul microscopic direct, iar Hegner şi Becker găsesc, pentru acelaşi parazit, un procent mai mare de infecţii prin culturi, decît prin examenul direct. Metodele de cultivare permit în plus o mai bună studiere a biologiei parazitului respectiv, pe care îl avem la îndemînă într-un mare număr de exemplare. Putem studia astfel cu uşurinţă rezistenţa sau sensibilitatea lui la anumite medicamente, precum şi putinţa de treceri experimentale la animale de laborator.

## Metoda de cultivare (îmbogăţire) a protozoarelor intestinale

### Cultivarea Entamoebei histolytica

Cultivarea acestei amibe a intrat în practica laboratoarelor de analize coproparazitologice odată cu cercetările încununate de succes ale lui Boeck şi Drbohlav (1924). Autorii de mai sus au preconizat utilizarea unui mediu difazic alcătuit dintr-un suport solidificat, dispus în plan înclinat, acoperit cu un lichid albuminos. Ca suport solidificat ei au utilizat întîi oul coagulat, iar ca lichid acoperitor, lichidul ovomucoid (ser fiziologic în care s-a incorporat unul sau mai multe albuşuri de ou.



Scanned with OKEN Scanner

Ulterior, substratul de ou coagulat a fost înlocuit cu geloză-Ringer sau geloză-sînge şi apoi cu ser sanguin coagulat (de cal sau de bou). Lichidul ovomucoid, la rîndul său, a putut fi înlocuit cu ser de cal diluat cu ser fiziologic, cu soluţie Ringer sau cu soluţie Locke.

E. Brumpt şi J. Sautet au arătat necesitatea adăugării la faza lichidă a unei cantităţi mici de amidon de orez fin pulverizat. R. Deschiens a arătat valoarea stimulatoare pentru creşterea amibidelor a unei mici cantităţi (0,02 g) de bilirubină.

Vom începe prin a prezenta modul de preparare a mediului Dorset (ou coagulat) pentru faza solidificată.

**Mediul Dorset.** *Modul de preparare.* Se lucrează în condiţii de asepsie. Deci sticlăria va fi fost sterilizată la pupinel, la 180°C. Ea va consta dintr-un balon de 500 ml, prevăzut cu perle de sticlă şi cu o pîlnie în loc de dop, un cilindru gradat de 50 ml, o baghetă de sticlă, o cutie Petri, una sau două pipete cu bulă de 10—20 ml. Se va steriliza şi o eprubetă mare, închisă cu un dop de vată de mărimea necesară astupării balonului, după ce oul a fost introdus în el. De asemenea, se vor steriliza la pupinel eprubetele în care se va distribui mediul.

1. Se spală bine cu apă 4 ouă de găină şi se sterilizează suprafaţa lor prin introducerea 10 min. în formol şi apoi 10 min. în alcool 96°. În loc de introducerea în formol se poate, tot aşa de bine, unge suprafaţa ouălor cu tinctură de iod.

2. Operatorul se va spăla bine pe mîini, ca înaintea unei intervenţii chirurgicale. Se trece conţinutul celor 4 ouă, prin pîlnie, în balonul de sticlă. Pentru aceasta se recomandă a se sparge oul la partea mai ascuţită şi ţinîndu-l cu 2 degete deasupra pîlniei balonului cu această parte mai ascuţită în jos, se sparge şi la partea mai rotunjită, deasupra camerei de aer, cu atenţie, pentru a nu sfîşia membrana inferioară de sub această cameră.

Se face prin suflare o presiune asupra conţinutului oului, care se va scurge în pîlnie. Noi am realizat mediul Dorset spărgînd lateral oul prin ciocnire de peretele cutiei Petri — aşa cum se practică în operaţiile culinare — dar cu mîinile bine spălate şi degetele unse cu tinctură de iod. De bagheta sterilizată ne folosim pentru a grăbi trecerea conţinutului celor 4 ouă (albuş şi gălbenuş) în balon.

3. Se scoate acum pîlnia şi se astupă balonul cu dopul de vată sterilizat. Se agită bine. Se măsoară cu cilindrul gradat 40 ml lichid Ringer sterilizat prin *filtrare bacteriologică* (sterilizarea prin autoclavare deteriorează bicarbonatul din soluţia Ringer şi modifică pH-ul soluţiei). Unii autori recomandă sterilizarea bicarbonatului separat, într-o fiolă închisă, la flacără, într-o porţiune mică de apă



Scanned with OKEN Scanner

(cca. 50 ml), care se sustrage din totalul de apă ce trebuie să intre în soluţia Ringer. Se prepară deci un Ringer din care să lipsească bicarbonatul. După sterilizarea acestuia la autoclav i se va adăuga, în cantitatea cuvenită, bicarbonatul ce fusese sustras. Dar această procedură e mai anevoioasă şi mai puţin practică decît utilizarea unui filtru bacteriologic.

Soluţia Ringer, sterilizată într-un fel sau altul, se adaugă cîte puţin în balon, sub agitare continuă, apoi conţinutul balonului se repartizează cu pipeta în eprubetele dinainte sterilizate, nu mai mult de 5 ml în fiecare eprubetă. Trebuie ţinut seama de faptul că amibele cresc numai în porţiunea inferioară a planului înclinat solid al mediului şi, în consecinţă, o înălţime mare a acestui plan e inutilă şi reprezintă material pierdut.

4. Se aşază eprubetele în plan înclinat şi se coagulează conţinutul, ţinîndu-le astfel o oră la 70—75°C. (Atenţie să nu se depăşească această temperatură !) Substratul bine coagulat are o culoare galben-aurie.

El se păstrează ca atare la gheţar şi nu i se adaugă faza apoasă decît în momentul însămînţării.

*Modul de preparare a lichidului ovomucoid.* Un albuş de ou recoltat steril, este amestecat cu 1 litru de soluţie Ringer sterilizată într-un balon de 2 litri, prevăzut cu perle de sticlă şi sterilizat în prealabil. Amestecul se face adăugînd soluţia Ringer treptat, în timp ce perlele de sticlă sînt agitate continuu. În articolul său din 1925, Drbohlav pune un albuş de ou la 500 ml soluţie Ringer, iar formula acestei soluţii este :

| | | |
|---|---|---|
| Apă distilată . . . . . | 1 000 | ml |
| Clorură de sodiu . . . . . | 6 | g |
| Clorură de potasiu . . . | 0,10 | g |
| Bicarbonat de sodiu . . . | 0,10 | g |
| Clorură de calciu . . . . | 0,10 | g |

pH-ul trebuie să fie 7,2—7,4.

Clorura de calciu se va adăuga ultima.

Faza lichidă se adaugă peste acea solidă, cu foarte puţin înaintea însămînţării. Ea nu trebuie să depăşească jumătate din înălţimea planului solid înclinat.

**Mediul L.E.S.** *(Locke, egg, serum).* Pentru noi „L.O.S." *(Locke, ou, ser).* Acest mediu preconizat de Boeck înlocuieşte lichidul Ringer la prepararea fazei solide, cu lichid Locke — a cărui principală deosebire de Ringer este că posedă şi glucoză.

Pe de altă parte, în acest mediu, la 4 ouă se pun 50 ml, în



Scanned with OKEN Scanner

loc de 40 ml din soluţia Locke.

O altă deosebire faţă de mediul anterior expus o constituie faptul că după repartizarea în tuburi şi coagularea mediului în plan înclinat, tuburile se sterilizează la autoclav 20 min., la 120°C, ceea ce ne scuteşte, în mare parte, de manoperele necesitate de prepararea aseptică a mediului.

În sfîrşit, o altă deosebire e înlocuirea ca fază apoasă a lichidului ovomucoid cu ser sanguin uman, diluat în proporţie de 1 : 8, cu soluţie Locke. Dacă serul nu a fost obţinut steril, va fi trecut printr-un filtru bacteriologic — după ce va fi fost diluat cu soluţia Locke.

Compoziţia soluţiei Locke e următoarea :

| | | |
|---|---|---|
| Apă distilată . . . . . | 1 000 | ml |
| Clorură de sodiu . . . . . | 9,0 | g |
| Clorură de potasiu . . . . | 0,4 | g |
| Bicarbonat de sodiu . . . | 0,2 | g |
| Glucoză . . . . . | 2,5 | g |
| Clorură de calciu . . . . | 0,2 | g |

Clorura de calciu se va adăuga ultima.

Soluţia, conţinînd bicarbonat de sodiu, va fi sterilizată prin trecerea prin filtru bacteriologic. Pentru prepararea fazei apoase sterilizarea se poate face prin filtru bacteriologic, odată cu aceea a serului sanguin pe care trebuie să-l dilueze 1 : 8.

**Mediul Dobell şi Laidlaw.** Ca substrat solid, oul este înlocuit cu ser sanguin coagulat. În mediul Dobell şi Laidlaw se foloseşte serul de cal. Ca lichid acoperitor se foloseşte soluţia Ringer în care, la un litru, au fost încorporate albuşurile a 4 ouă, deci o cantitate de albumină mai mare decît aceea a lichidului ovomucoid care acoperea mediul Dorset.

**Mediul Simici.** Acest autor înlocuieşte ca substrat solid serul de cal cu ser de bou, pe care îl amestecă în prealabil, în proporţie de 3 : 1, cu bulion glucozat 1%, preparat după formula :

| | | |
|---|---|---|
| Carne de vacă . . . . . | 500 | g |
| Peptonă . . . . . | 20 | g |
| Clorură de sodiu . . . . . | 5 | g |
| Glucoză . . . . . | 10 | g |
| Apă . . . . . | 1 000 | ml |

Se prepară după ordinea bacteriologică obişnuită.

Se ridică pH-ul uşor, cu adaos de hidroxid de sodiu.

Ca fază lichidă utilizează lichidul Ringer, iar ca aliment figurat, amidonul de orez.



Scanned with OKEN Scanner

Pentru însămînţare este bine să se pornească de la forme vegetative, a căror prezenţă poate fi forţată prin administrarea unui purgativ salin — fie într-o doză unică, fie în mai multe doze fracţionate zilnice (5—10 g pe zi).

Iată, după M. Langeron (1942), procedeul de cultivare recomandat de Simici :

1. se însămînţează o picătură de materii fecale pe mediul Simici şi se adaugă o cantitate mică de amidon de orez ;

2. se păstrează la 37°C, într-un pahar conic, o diluţie 1 : 3 de materii fecale cu lichid Ringer şi amidon de orez. Ambele ultime substanţe trebuie să fi fost sterilizate în prealabil. Soluţia Ringer se sterilizează prin filtru bacteriologic, iar amidonul se introduce în tubuşoare de sticlă, cu dop de vată, şi se pune în pupinel o oră, la 140—160°C, trei zile în şir ;

3. peste 6 ore de la însămînţare se reînsămînţează eprubeta cu o nouă picătură de scaun prelevată din diluţia de mai sus ;

4. după 10—12 ore se înlocuieşte lichidul din eprubetă cu un lichid Ringer nou, prealabil încălzit la 37°C, şi cu amidon de orez nou. Această preschimbare a fazei lichide se poate întîrzia pînă la 24 de ore ;

5. se reînsămînţează, după 48 de ore, pe un tub nou ;

6. dacă în cursul trecerilor multiplicarea amibelor scade, se va adăuga în tuburile de cultură puţin carbonat de calciu.

Pentru treceri şi examinări din cultură trebuie utilizată o pipetă Pasteur mai largă, cu care în prealabil se raclează suprafaţa inferioară a planului înclinat, pentru a detaşa amibele aderente de faza solidă, şi se aspiră acest produs de raclaj, împreună cu depozitul din fundul tubului.

Mediul Simici şi procedeul său expus mai sus sînt utilizate azi pe scară largă, şi la noi.

Observarea la microscop a amibelor din culturi trebuie făcută în condiţiile unei atmosfere calde — în jurul a 37°C. Pentru aceasta microscopul se introduce într-o cutie specială denumită etuva Foot. E încălzită cu ajutorul mai multor becuri electrice, care pot fi aprinse toate deodată sau separat. Ele se găsesc pe peretele din fund al cutiei — becul din mijloc servind în acelaşi timp şi pentru iluminatul microscopului. În peretele din faţă al etuvei sînt realizate două mari deschideri circulare. Ele sînt împrejmuite de nişte mînecuţe de stofă, prin care trec mîinile microscopistu-



Scanned with OKEN Scanner

lui pentru manevrarea obiectivelor, vizelor şi preparatelor supuse observaţiei. Se evită astfel pierderea de aer cald prin deschiderile peretelui (vezi fig. 15).

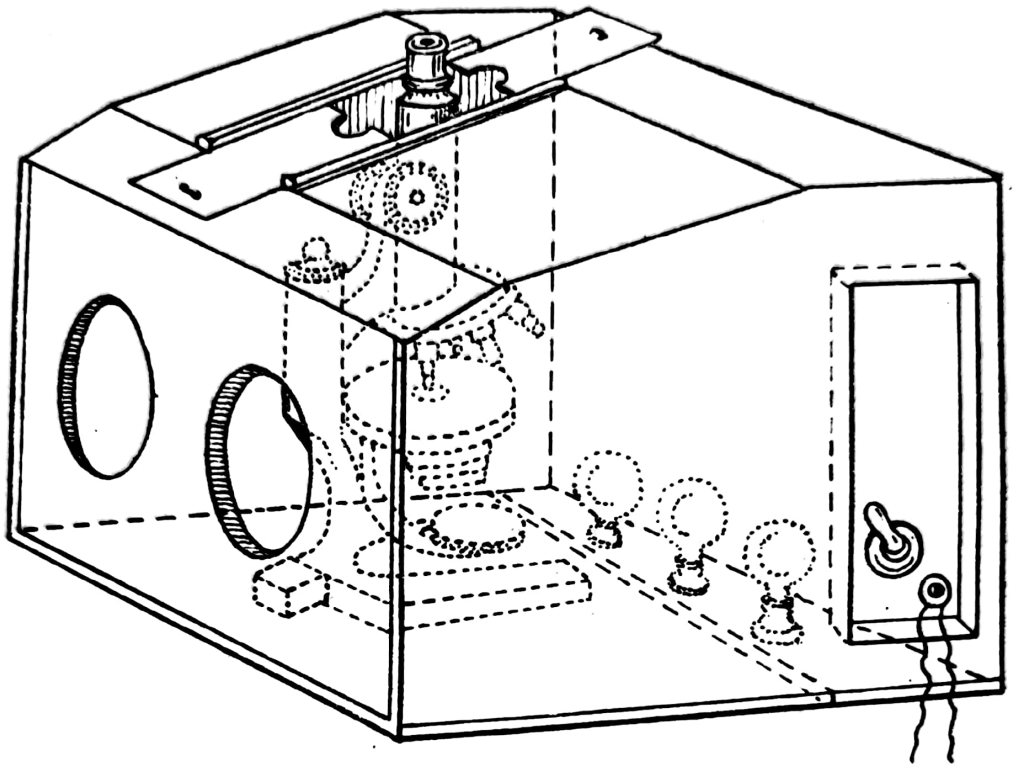


*Fig. 15.* — Etuva N. Foot. Modelul introdus de V. Nitzulescu la laboratorul de parazitologie al Facultăţii de medicină din Iaşi.

Cultura de amibe se poate face şi prin însămînţarea de chisturi. Pentru aceasta chisturile sînt în prealabil concentrate după metoda Bidegaray, expusă la pag. 36, metodă care simplifică procedura mai laborioasă a unei metode anterioare, aceea a lui Yorke Adams.

## Cultura flagelatelor intestinale: Trichomonas, Embadomonas, Chilomastix

**Medii monofazice** (reprezentate exclusiv prin faza lichidă). **Mediile J. M. Hogue.**

Lichidul de cultură poate fi :

1. ser fiziologic 8,5‰, la care se adaugă, în proporţia de 1 : 10, ser sanguin de oaie diluat cu apă distilată 1 la 3 ;

2. sau ser fiziologic 7‰, 300 ml, la care se adaugă, sub agitare cu perle de sticlă, albuşurile a 3 ouă. Se încălzeşte în baie



Scanned with OKEN Scanner

marină la fierbere cca jumătate oră şi se filtrează printr-un strat de vată (în prealabil umezită cu ser fiziologic) ;

3. sau lichid Locke, la care se adaugă, la 200 ml, conţinutul întreg al unui ou. Se încălzeşte un sfert de oră la baie marină la fierbere şi se filtrează într-o pătură de vată.

După trecerea în tuburi, mediul de la nr. 1 se sterilizează în autoclavul deschis (deci la 100°C), cîte o oră pe zi, trei zile în şir, iar cele de la nr. 2 şi 3, prin autoclavare, 20 min., la 120°C.

**Mediul Balamuth.** Acest mediu monofazic mai nou (1946) necesită o metodă de preparare mult mai laborioasă, a cărei descriere, după H. Cassagne, o dăm mai jos :

I. a) 4 ouă foarte proaspete se răscoc prin fierbere timp de 15 min. Se scot gălbenuşurile, se triturează în mojar, sub adăugare treptată de 125 ml ser fiziologic 8‰ ;

b) amestecul de mai sus, cît mai bine omogenizat, se încălzeşte 10 min. la fierbere într-un balon, sub agitaţie continuă ;

c) se completează cu apă distilată apa care s-a evaporat. Se filtrează printr-o pînză groasă, prin stoarcere, şi se obţin circa 100 ml lichid de culoare galben-deschis ;

d) se completează la 125 ml cu ser fiziologic ;

e) se sterilizează balonul la autoclav 20 min., la 120°C. Se produce un precipitat galben. Se răceşte la 10°C şi se filtrează conţinutul balonului prin mai multe foi de hîrtie de filtru, aşezate pe o pîlnie Büchner. Se obţine un lichid limpede.

II. Se prepară separat 2 soluţii tampon. Prima (soluţia A) conţine 174, 180 g fosfat bipotasic la 1 000 ml apă distilată. A doua (soluţia B) conţine 136,092 g fosfat monopotasic la 1 000 ml apă distilată.

Se amestecă 86 ml soluţie A cu 14 ml soluţie B şi se obţin astfel 100 ml „soluţie mamă". În momentul utilizării, această soluţie mamă va fi diluată 1 : 15 cu apă distilată.

III. Pe de altă parte, se amestecă într-un balon cu gît larg, prevăzut cu perle de sticlă, 100 ml apă distilată şi 5 g pulbere de ficat DIFCO. Se filtrează prin hîrtie sau vată şi se sterilizează la autoclav 20 min., la 120°C.

IV. Se amestecă acum :

— infuzia de gălbenuş de ouă (prima soluţie) . . . . 90 ml
— soluţia tampon „soluţia mamă" diluată 1/15 . . . 90 ml
— soluţia pulbere de ficat . . . . . 20 ml

Se repartizează în tuburi (cîte 4,5 ml pe tub).



Scanned with OKEN Scanner

Se sterilizează la autoclav 20 min., la 120°C, şi se păstrează la frigider.

Fiecare tub va fi încălzit la termostat la 37°C înaintea însămînţării şi va primi puţin amidon de orez sterilizat.

Bailenger găseşte că acest mediu ar avea dezavantajul de a cuprinde globule care, prin mărime şi refringenţă simulează amibele la o mărire mică la microscop şi îngreuiază, prin aceasta, citirea rezultatelor.

Toate mediile de mai sus sînt reprezentate exclusiv prin faza lichidă. Se poate realiza cultura protozoarelor intestinale flagelate (cu excepţia *Giardiei)* şi pe medii difazice analoge cu cele descrise mai sus pentru cultura amibelor.

Pentru cultura parazitului infuzor *Balantidium coli,* Simici foloseşte cu succes mediul difazic Dorset, acoperit cu Ringer, sau mediul Löffler (ser de bou coagulat), acoperit cu Ringer. Ca aliment figurat, amidonul de grîu. E. Schumacker foloseşte un mediu exclusiv lichid, alcătuit din ser sanguin de cal diluat 1 : 9 cu soluţie Ringer. Ca aliment figurat, amidon de cartofi sau de grîu.

Optimum de temperatură pentru cultivarea tuturor paraziţilor intestinali de mai sus este cea de 36—37°C.

### Cultivarea coccidiilor

Aici cuvîntul „cultivare" are un alt înţeles decît mai sus. Este vorba doar de punerea oochisturilor în condiţii de natură a le da posibilitatea să-şi continue evoluţia pînă la formarea sporozoiţilor, deci pînă la căpătarea aspectului intern tipic după care să putem face identificarea lor.

Este suficient pentru realizarea acestui scop să păstrăm materiile fecale două-trei zile la 25°C. Dar fermentaţiile care se produc ar putea fi nocive evoluţiei coccidiilor. De aceea, se recomandă să se amestece materiile fecale cu pulbere cărbune vegetal — aşa cum se practică la concentrarea larvelor de *Strongyloides.*

Mai bine este încă să facem să intervină o substanţă care, opunîndu-se dezvoltării de germeni străini, să nu fie vătămătoare pentru coccidii. Cea mai indicată este acidul cromic.

*Metoda :* se face o diluţie de materii fecale în apă (distilată sau de robinet), în proporţia de 1 : 20. Se trece diluţia printr-o sită metalică sau se supune la o sedimentare rapidă, pentru a o debarasa de porţiunile grosolane din suspensie, şi se trece într-un flacon Erlenmeyer, pe al cărui fund va forma un strat relativ subţire.



Scanned with OKEN Scanner

Se adaugă o aceeaşi cantitate de acid cromic 1%, ceea ce va transforma concentrarea acidului cromic în 0,5%, şi va produce o diluare a materiilor fecale la 1 : 40. Flaconul Erlenmeyer se acoperă cu un dop de vată. Suprafaţa mare de aeraţie, pe fundul flaconului, e avantajoasă evoluţiei coccidiilor.

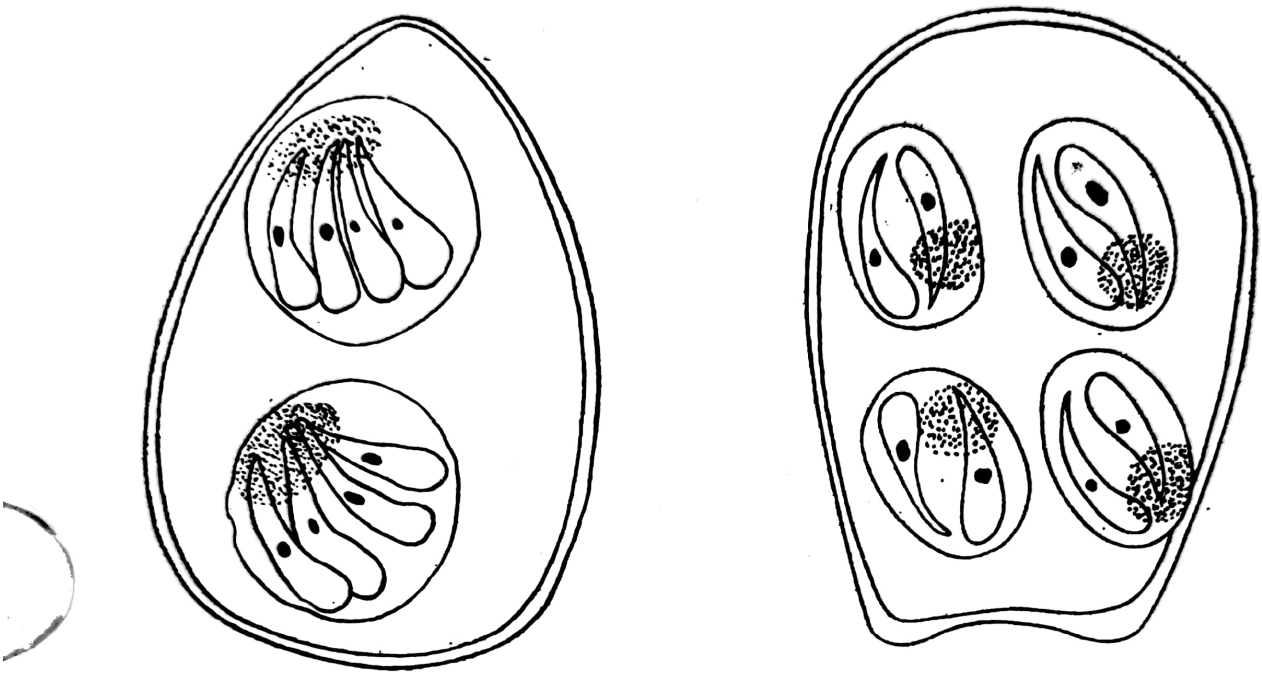


*Fig. 16.* — Oochisturi de coccidii în cultură. În stînga, oochist de *Izospora* (disporocistid tetrazoic). În dreapta oochist de *Eimeria* (tetrasporocistid dizoic).

Se lasă flaconul la 25°C şi se examinează după 48—72 de ore, cînd oochisturile îşi vor fi terminat modificările interne şi vom putea observa dacă e vorba de o coccidie de tipul *Izospora* (disporocistid tetrazoic) sau de tipul *Eimeria* (tetrasporocistid dizoic) (fig. 16).

## Metoda de îmbogăţire pentru helminţi

### Cultivarea larvelor de Strongyloides stercoralis

Am arătat mai sus metodele de concentrare a larvelor de *Strongyloides* din materiile fecale şi utilizarea lor în scop diagnostic. Larvele, în mijlocul unui amestec de materii fecale şi praf



Scanned with OKEN Scanner

de cărbune, pot să-şi continue evoluţia în acest nou mediu. Unele larve rabditoide se transformă în larve filariforme strongiloide, dar unele se vor putea transforma în adulţi (masculi şi femele), iar aceştia, la rîndul lor, prin depunere de ouă, vor genera noi larve — deci se va produce o multiplicare a paraziţilor, în condiţii de umezeală şi aeraţie potrivite. Asemenea culturi urmărite 2—3 săptămîni prezintă un mare interes ştiinţific pentru lămurirea anumitor probleme legate de biologia paraziţilor, dar ies din cadrul pe care ni l-am propus în prezenta lucrare şi care se mărgineşte la studiul metodelor pentru descoperirea prezenţei paraziţilor şi la identificarea paraziţilor descoperiţi.

# Metode speciale de depistare a unor elemente parazitare

## Căutarea ouălor de oxiuri

Oxiurii nu îşi depun ouăle în intestin. Deci ouăle lor nu vor putea fi înglobate în masa fecală şi nu vor putea fi găsite decît excepţional prin analizele coproparazitologice descrise mai sus. Oxiurii femele, cu uterele pline de ouă, în care s-a format deja o larvă giriniformă, migrează din regiunea cecală către orificiul anal, prin care ies în mod activ. Ei îşi depun întreg pachetul de ouă undeva, în jurul acestui orificiu, uneori pe pliurile mucoase ale orificiului anal, alteori ceva mai departe, pe regiunea cutanată perianală.



Scanned with OKEN Scanner

Rezultă două consecinţe :

— prima, că metodele de analize coproparazitologice nu sînt valabile pentru depistarea enterobiozei şi e bine de a menţiona acest fapt pe buletinele de analiză ;

— a doua, că pentru depistarea enterobiozei trebuie aplicate alte metode, speciale, care să permită găsirea ouălor în regiunile din afara tubului digestiv în care au fost depuse.

Vom cita în primul rînd metoda N.I.H. Numele îi vine de la iniţialele celor 3 cuvinte care desemnează Institutul naţional de igienă american, în care M. Hall a elaborat metoda (National Institute of Health).

**Metoda N.I.H. sau metoda Hall** constă în îmbrăcarea extremităţii terminale a unei baghete cu o foiţă de celofan. Vîrful baghetei, bine rotunjit la flacără, se aplică iniţial vertical pe mijlocul foiţei de celofan, care apoi se răsfrînge, înconjurînd de jur-împrejur capătul baghetei. Un inel de cauciuc, de un diametru ceva mai mic decît acela al baghetei, înconjură marginile răsfrînte ale foiţei de celofan, pe care o fixează pe baghetă. Foiţa de celofan, care îmbracă astfel bagheta, va căpăta o serie de pliuri longitudinale. Ea se aplică pe regiunea perianală şi cu ea se şterg pliurile perianale, cît şi întreaga regiune înconjurătoare. În această „măturare" a regiunii respective, ouăle depuse care sînt întîlnite vor adera de celofan. În recoltare ne ajută mult însăşi pliurile longitudinale ale celofanului. Bagheta poate fi introdusă şi în orificiul anal — ca un ecuvion — şi atunci foiţa de celofan poate fi pusă să „mături" pereţii interiori ai intestinului terminal, unde s-ar putea găsi ouă de oxiuri eliminate de viermi în mişcările lor active în ampula rectală, înainte de a ieşi afară pentru a-şi depune majoritatea ouălor lor. (fig. 17).

Foiţa de celofan este scoasă apoi de pe baghetă, prin secţionarea inelului de cauciuc care o menţine fixată, şi este întinsă pe o lamă de sticlă (în general o lamă de microscopie) într-o picătură de glicerină, de ulei de cedru sau de xilol. Se acoperă cu o lamelă şi preparatul astfel realizat e examinat la microscop.

**Metoda Schüffner şi Swellengrebel.** Aceşti autori recomandă în 1943 utilizarea unui aparat foarte simplu, constituit dintr-un tub de pipetă scurt de 20—30 cm, care la un capăt este închis şi umflat în forma unei bule sferice terminale. Suprafaţa acesteia este depolizată, pentru a o face aspră. Cu această extremitate sferică, uşor umectată, se freacă uşor pliurile anale şi regiunea perianală. Ouăle de oxiuri aderă de suprafaţa depolizată. Această extremitate a aparatului este apoi introdusă într-o picătură de apă, pe o lamă



Scanned with OKEN Scanner

microscopică, și întoarsă pe loc, pentru ca ouăle de pe ea să se despartă și să treacă în apă. Picătura se lasă apoi să se usuce. În momentul examinării se pune pe ea o picătură de glicerină, de ulei de cedru sau de toluol și se acoperă cu o lamelă (fig. 18).

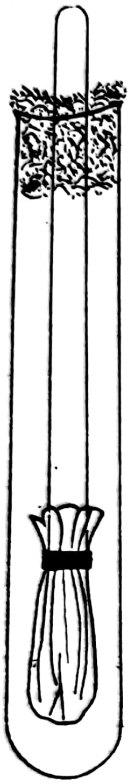


Fig. 17

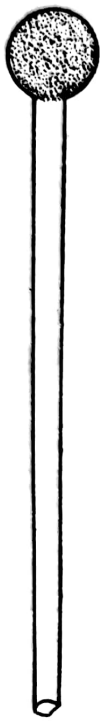


Fig. 18

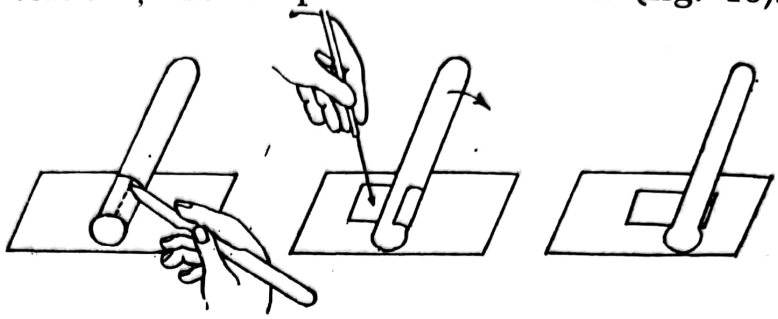


Fig. 19

*Fig. 17.* — Bagheta învelită la capăt cu celofan din metoda N.I.H.

*Fig. 18.* — Aparatul propus de Schüffner și Swellengrebel.

*Fig. 19.* — Metoda foiței de colodiu, propusă de Nitzulescu și Popescu.

**Metoda baghetelor colodionate.** Această metodă, propusă de V. Nitzulescu și I. Popescu în 1948, se execută în modul următor (fig. 19) :

— se folosește o baghetă de sticlă cu diametrul de 8 mm și lungimea de 15—20 cm ;

— se unge unul din capete cu glicerină ;

— se înmoaie de mai multe ori această extremitate, menținută vertical, într-un flacon conținînd o soluție 4% de colodiu medicinal. Adîncimea la care se cufundă extremitatea baghetei va fi de 24—26 mm ;

— se lasă bagheta să se usuce la aer ;

— se va obține astfel o peliculă subțire de colodiu, care formează o foaie înconjurătoare a extremității baghetei, și a cărei lățime va fi de 24—26 mm.

Pentru a-i mări adezivitatea este de recomandat trecerea foarte rapidă a extremității colodionate, înaintea întrebuințării, printr-un amestec în părți egale de alcool-eter. Se agită rapid pentru a se zvînta și se utilizează imediat după aceea.



Scanned with OKEN Scanner

Bagheta se întrebuinţează atît pentru culegerea ouălor de pe pliurile perianale, cît şi ca un curăţitor a suprafeţelor interioare („écouvillon"), fiind introdusă în orificiul anal, pentru a culege, printr-o mişcare circulară, plimbată pe mucoasa ampulei rectale, ouăle de oxiuri care se găsesc în mucusul de pe această mucoasă.

Pentru a examina ouăle care au aderat la colodiu se începe prin a separa cu un bisturiu extremitatea foiţei de colodiu care îmbracă, ca o calotă, capătul baghetei, porţiune de colodiu ce va fi aruncată. Nu se va păstra decît restul de colodiu care îmbracă, ca un cilindru înalt de 20—22 mm, extremitatea baghetei.

Se deschide acest cilindru printr-o tăietură de bisturiu — în lungul uneia din generatricele sale — şi cu vîrful aceluiaşi bisturiu insinuat între colodiu şi sticlă se decolează una din laturile cilindrului.

Extremitatea baghetei se introduce într-o picătură de glicerină 50% sau chiar de apă.

Se fixează cu vîrful bisturiului partea decolată a cilindrului de colodiu şi, printr-o mişcare de învîrtire în lungul axei sale a baghetei, se desfăşoară pe lamă, în picătura de glicerină sau de apă, întregul cilindru de colodiu, sub forma unei foiţe dreptunghiulare.

Aceasta se acoperă cu o nouă picătură de glicerină sau de apă şi cu o lamelă 22 × 32 mm şi se examinează la microscop.

**Alte metode.** Autorii sovietici P. I. Serbinov şi E. S. Schulman (1927) au propus o metodă mult mai simplă de recoltare a ouălor de oxiuri din pliurile perianale, prin raclarea directă a acestor pliuri cu un chibrit de lemn tăiat la un capăt sub formă de lopăţică. După trecerea prin pliurile perianale, chibritul lasă ceea ce a culeş în operaţia de raclare într-o picătură de glicerină 50% cu apă. Picătura se acoperă cu o lamelă.

Mai recent, V. V. Kaledin propune pentru raclarea pliurilor perianale utilizarea unor discuri de celoidină, decupate cu perforatorul de dopuri dintr-un film radiologic, bine curăţat în prealabil de pătura cu substanţă sensibilă. Discul se apucă de una din margini cu o pensă fină şi se înmoaie marginea opusă în glicerină 50%. Se execută apoi raclarea pliurilor, discul fiind menţinut tot de pensă. În cursul raclării se adună pe faţa inferioară a marginii raclante impurităţile din pliuri şi ouăle de oxiuri existente.

Apoi această substanţă adunată se emulsionează pe lamă, într-o picătură de glicerină 50%, şi picătura se acoperă cu discul de celoidină, care serveşte acum ca lamelă pentru preparaţia microscopică. După fiecare nouă utilizare pensa se va steriliza prin trecerea prin flacără.



Scanned with OKEN Scanner

În 1972 Kaledin perfecționează metoda sa astfel : discul de celuloid se umectează înainte de raclare cu o soluție 1% de NaOH. Pe lamă se pune o picătură de silicat de sodiu, în care se va face o incluzie durabilă a ouălor de pe disc. Preparatele vor fi deci mai durabile, dar citirea lor nu se poate face decît în curs de 10 zile, întrucît mai tîrziu mediul se fisurează, ceea ce îngreuiază citirea. Mediul cu silicat împiedică, pe de altă parte, putința de răspîndire a ouălor în mediul extern. Lamele se dezhelmintizează ulterior prin fierbere, în cursul căreia se desprind și rondelele de celuloid.

Engelbrecht (1965) propune utilizarea unui tampon de vată pe vîrful unui băț de chibrit. Se înmoaie vîrful tamponului în hidroxid de potasiu 1% sau chiar și numai în apă. Se așază vertical pe orificiul anal, se înclină ușor și, cu mișcări semicirculare, se șterg cu el pliurile anale, după care vîrful tamponului poate fi introdus și în orificiul anal. Apoi tamponul se introduce în alcool 60% care se găsește într-un tub de o mărime corespunzătoare și închis cu dop de plută. Alcoolul 60% omoară sigur ouăle de oxiuri. Pentru examinare se scutură bine tamponul în alcool, iar alcoolul se pune la centrifugă 3—5 min., la 1 000—1 500 turații. Din sediment se culeg 3 picături — cîte una pentru o lamă — care se examinează sub lamelă la microscop.

**Metoda Graham** (1941). Acest autor folosește o foiță de celofan, sub forma unei panglici, însă acoperită pe una din fețele ei cu o substanță adezivă. Ea se aplică, cu fața adezivă, pe regiunea de pe care urmează a fi recoltate ouăle de oxiuri, după care panglica de celofan e pusă pe o lamă de microscopie, cu fața adezivă în contact cu sticla. Fața neadezivă, care rămîne deasupra va juca un rol de lamelă. Această metodă aduce, față de cele precedente, două avantaje : întîiul — numărul de ouă pe care-l recoltează e cu mult mai mare, grație adezivului care le extrage de pe suprafața pe care au fost depuse și le reține pe celofan. Al doilea — scutirea folosirii de lamele, deci un avantaj economic. Pentru perfecționarea metodei cu adeziv se recomandă introducerea unei picături de toluol (Beaver) sau de ulei de cedru (Ho Thi Sang) între celofan și sticlă. Această picătură are, pe de o parte, rolul de a elimina bulele mici de aer de sub celofan — care ar împiedica buna citire a preparatului — iar pe de alta, de a clarifica și mai mult cîmpul supus examinării microscopice. Ouăle de oxiuri apar refringente, foarte ușor vizibile, pe un cîmp foarte clar.

În ce privește modul în care se aplică celofanul adeziv există foarte multe variante. Toate sînt bune. Se poate folosi — așa cum practica Graham — o langhetă de lemn, pe una din extremitățile căreia încalecă panglica de celofan cu fața adezivă în afară. Cele 2



Scanned with OKEN Scanner

capete ale foiţei sînt reţinute cu indexul şi degetul cel mare al mîinii drepte. Cu această langhetă se presează pliurile orificiului anal (cu una din feţe) şi regiunea perianală (cu cealaltă faţă). Alţi autori folosesc în locul langhetei o eprubetă al cărui fund e îmbrăcat similar cu cele 2 laturi ale panglicii de celofan. Se poate la fel încercui fundul eprubetei cu panglica de celofan, lipind una de alta extremităţile ei. Ho Thi Sang propune o metodă încă şi mai simplă, aceea de a îmbrăca pe degetul cel mare al mîinii drepte, panglica de celofan (eliminînd deci şi langheta şi eprubeta) şi de a presa cu degetul acoperit de celofan pliurile anale şi regiunea perianală. Acest din urmă procedeu dă totuşi mai multe posibilităţi de a ne infecta cu ouăle parazitului.

Există în comerţ panglici de celofan cu adeziv, în rulouri destinate în practica de toate zilele la repararea bancnotelor rupte sau pentru închiderea rapidă a unor colete. Ele poartă numele de „scotch", de unde metodei Graham i se dă încă şi numele de „metoda scotch"-ului.

Bailenger recomandă utilizarea unei lame de material plastic transparent — asemănătoare lamelelor de microscopie din sticlă. Jumătate din suprafaţa superioară a lamei e acoperită cu un strat foarte fin de material adeziv care, la rîndul său, e acoperit de o foiţă de celofan de aceeaşi mărime. Foiţa spre mijloc posedă o porţiune liberă, neaderentă, pe care o putem cu uşurinţă apuca între degete. Pe cealaltă jumătate a lamei se lipeşte o etichetă cu datele care ne interesează asupra bolnavului (număr, data recoltării etc.). În momentul recoltării se apucă între degete extremitatea liberă a foiţei de celofan, care se trage şi se dezlipeşte. Se aplică acum jumătatea lipicioasă a lamei astfel descoperită pe regiunea de pe care voim a recolta ouăle de oxiuri (pliuri anale, regiune perianală). După un foarte scurt contact lama se acoperă din nou cu foiţa de celofan. În momentul examinării la microscop se poate introduce prin ridicarea pe trei sferturi a foiţei de celofan o picătură de toluol, ulei de cedru sau de glicerină, între celofan şi lamă, şi se acoperă din nou cu celofanul (fig. 20).

Prelevarea ouălor de oxiuri trebuie făcută de preferinţă dimineaţa, înainte ca bolnavul respectiv să fi avut scaun şi înainte de a se fi spălat în regiunea anală. Cum un singur control negativ nu dă încă certitudinea că bolnavul nu are oxiuri, se recomandă, în cazurile în care testăm valoarea unui medicament antioxiurian, 7 controale succesive, zilnice, care toate trebuie să rămînă negative.

Un alt ou susceptibil să apară prin metoda celofanului adeziv e oul de *Taenia saginata*. Se ştie că segmentele bătrîne ale acestui cestod părăsesc spontan intestinul, forţînd sfincterul anal, şi



Scanned with OKEN Scanner

se elimină între scaune. Or, în cursul forţării sfincterului anal unele ouă părăsesc segmentul graţie unor sfîşieri ale cuticulei viermelui şi rămîn depuse, fie pe pliurile anale, fie chiar pe întreaga regiune perianală pe care se mişcă segmentul respectiv.

Şi ouăle de *Schistosoma mansoni* pot apărea pe celofanul adeziv.

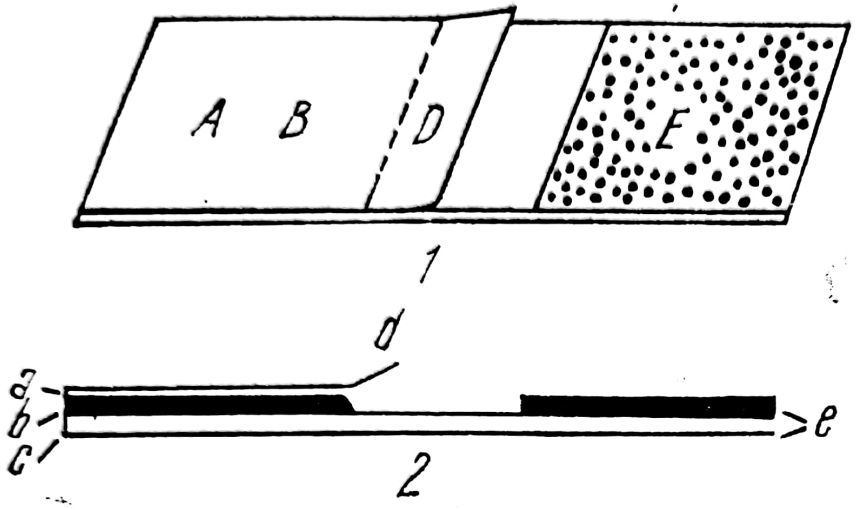



*Fig. 20.* — Lama adezivă propusă de J. Bailenger.
*Sus* — lama văzută de deasupra ; *jos* — lama văzută în secţiune :
a — foiţă de celofan ; b — material adeziv ; c — lama ; d — partea liberă a foiţei de celofan ; e — eticheta.

# Metode speciale de fixare şi colorare aplicabile la elementele parazitare în examenul coproparazitologic

## Tehnici speciale pentru fixarea şi colorarea rizopodelor

**Fixarea.** Se aleg din materiile fecale porţiunile mucoase, glerele, cu care se fac frotiuri pe lame de microscopie.

Frotiul se face în mod oarecum analog cu acela de sînge — folosind o lamelă. Materialul care se adună în unghiul diedru dintre lamelă şi lamă e tîrît înainte prin avansarea lamelei, care de data aceasta se face de o manieră specială, sacadată, zigzagînd mersul acesteia.



Scanned with OKEN Scanner

Frotiul nu trebuie lăsat să se usuce şi, cît e încă umed, lama va fi introdusă cu faţa cu frotiul în jos într-un lichid fixator. Cum frotiul nu trebuie să ia contact cu fundul recipientului, vom utiliza pentru fixare fie cutii Laveran (de tipul care se utilizează pentru colorarea lamelor de sînge), fie cutii Petri, în care au fost introduse 2 baghete subţiri de sticlă pe care se va odihni lama cu frotiul în jos.

Lichidele fixatoare cele mai adecvate sînt : lichidul Bouin, lichidul Duboscq-Brazil şi sublimatul acetic al lui Schaudinn. Lichidul Bouin are următoarea compoziţie :

| | |
|---|---|
| Soluţie apoasă saturată de acid picric . . | 30 volume |
| Formol din comerţ (40%) . . . . . | 10 volume |
| Acid acetic glacial . . . . . | 2 volume |

E preferabil ca amestecul să se facă extemporaneu. În nici un caz acidul acetic nu se va pune mai dinainte, ci numai în momentul utilizării.

Fixatorul Duboscq-Brazil are următoarea compoziţie :

| | |
|---|---|
| Alcool 80° . . . . . | 150 ml |
| Formol din comerţ (40%) . . . . | 60 ml |
| Acid acetic glacial . . . . . | 15 ml |
| Acid picric . . . . . | 1 g |

Se dizolvă mai întîi acidul picric în alcool şi se adaugă apoi formolul şi, cel din urmă, acidul acetic (imediat înaintea utilizării).

Fixatorul lui Schaudinn se prepară amestecînd :

| | |
|---|---|
| Soluţie apoasă saturată de biclorură de mercur . . | 60 ml |
| Alcool 96° . . . . . | 30 ml |
| la care se poate adăuga : | |
| Acid acetic glacial . . . . . | 4,5 ml |

Lama va rămîne în fixator între 30 de min., pînă la cel mult 60 de min. Apoi poate fi ridicată şi introdusă vertical într-un pahar Borrel. Se pot introduce deodată într-un pahar Borrel 3 lame, dacă se utilizează o prismă de sticlă (asemănătoare cu acelea utilizate pentru susţinerea tacîmurilor la masă !). Prisma are 3 feţe (cîte o lamă în dreptul fiecărei feţe). În lipsa acestei prisme se pot pune într-un Borrel cîte 2 lame alăturate, cu feţele cu frotiul în afară.



Scanned with OKEN Scanner

**Spălarea lamelor fixate şi aducerea lor la apă.** Atunci cînd s-a utilizat ca fixator sublimatul Schaudinn, lamele vor fi trecute într-un pahar Borrel cu alcool 70°, colorat pînă la o culoare franc-galbenă, cu soluţie lugol. După ce rămîn 5—10 min. în acest lichid, în care, pentru a mări acţiunea iodului ridicăm şi coborîm lama de cîteva ori, trecem lamele în unul sau două alcooluri 50°, fără iod şi apoi în apă.

Pentru fixatorul Bouin trecerea printr-un lichid iodat nu e necesară. Lamele vor fi trecute direct în apă, dar apă alcalinizată cu carbonat de litiu 1%, pentru eliminarea acidului picric, după procedeul Jellinek, apoi în apă curată.

Pentru fixatorul Duboscq-Brazil se vor trece întîi în alcool 70°, apoi în apă cu carbonat de litiu şi apoi în apă curată.

**Colorarea.** Cea mai fină coloraţie pentru nucleul rizopodelor se poate obţine cu hematoxilina ferică. Pentru aceasta se începe prin a introduce lamele într-un mordant.

Mordansarea lor se face într-o soluţie 3% de alaun de fier amoniacal. La prepararea soluţiei se vor alege cristale mari şi violete. Cele mici, care au căpătat o nuanţă galbenă sau cenuşie, sînt alterate şi vor fi eliminate. Cristalele se raclează cu o lamă de bisturiu şi pulberea rezultată se dizolvă în proporţie de 3% în apă. Soluţia nu se conservă decît foarte puţin. E bine să fie utilizată în primele 24 de ore.

Lamele pot rămîne în mordant mai multe ore — chiar pînă în ziua următoare — după care sînt trecute rapid prin apă distilată, pentru a le debarasa de excesul de mordant, şi introduse într-o soluţie de hematoxilină. Această soluţie se prepară pornind de la o soluţie 10% de hematoxilină în alcool 90°. Din această soluţie alcoolică se prepară soluţia apoasă, punînd 10 ml soluţie alcoolică la 90 ml apă. Rezultă că hematoxilina va fi în cantitate de 1%. Prepararea se face din vreme, cel puţin cu 15 zile mai înainte, pentru a da timp hematoxilinei să se matureze. Se păstrează în sticlă necolorată.

La coloraţie se produce lacul feric de hematoxilină. Lichidul devine negru, ca şi frotiurile. Lamele vor fi lăsate aici cel puţin 30 de min. — dar e mai bine să fie lăsate chiar 12 ore. În acest timp ele se supracolorează.

**Diferenţierea.** Se face apoi diferenţierea care reprezintă timpul cel mai dificil al coloraţiei. Se face într-o soluţie nouă de alaun de fier amoniacal 1%. Diferenţierea se urmăreşte la microscop — introducînd lama trecută întîi prin apă (pentru a o debarasa de excesul de diferenţiator), într-un Petri. Se pune pe frotiu puţină apă



Scanned with OKEN Scanner

distilată şi o lamelă curată şi se urmăreşte mersul diferenţierii sub obiectivul microscopului. Greutatea este de a cădea în această operaţie delicată pe paraziţi care să reprezinte majoritatea formelor prezente în frotiu, căci grosimea frotiului fiind variată şi coloraţia care a pătruns inegal în aceste variaţii de grosime va fi inegală. Un element va putea fi mai colorat decît altul şi, la fel, el va putea fi mai tare diferenţiat ca altul. Diferenţierea se face relativ repede şi de aceea trebuie procedat cu repeziciune. Altminteri riscăm să lăsăm să se şteargă culoarea prea mult printr-un exces de diferenţiere. Această greşeală e de altfel uşor de corijat. Reintroducînd lamele în colorant ele se colorează din nou şi reîncepem diferenţierea lor. Atunci cînd am socotit că procesul de diferenţiere s-a terminat, oprim avansarea ei, introducînd lama în apă distilată.

Odată colorate, frotiurile sînt supuse deshidratării prin trecerea printr-o serie de alcooluri, pînă la alcool absolut, apoi xilol fenicat şi, în sfîrşit, xilol pur şi balsam de Canada. În toate aceste manipulări se va evita cu grijă uscarea frotiului. În nici un moment el nu trebuie lăsat să se usuce, pînă la înrobarea în balsam de Canada.

**Coloraţia cu negru-clorazol.** Această coloraţie a fost propusă relativ recent de J. Cohn. Colorantul necesar se prepară astfel :

— se prepară mai întîi amestecul lichid de mai jos, denumit lichid de bază :

| | |
|---|---|
| Alcool etilic 90° . . . . . | 170 ml |
| Alcool metilic . . . . . | 160 ml |
| Acid acetic glacial . . . . . | 20 ml |
| Acid fenic lichid . . . . . | 20 ml |
| Acid fosfotungstic 1% . . . . . | 12 ml |
| Apă distilată q.s. pentru . . . . | 1 000 ml |

— în acest lichid se dizolvă 5 g de negru-clorazol. Cele 5 g sînt introduse cîte puţin într-un mojar şi frecate, turnînd peste ele, încetul cu încetul, cantităţi mici din lichidul de bază, forţîndu-se astfel dizolvarea colorantului. Va mai rămîne totuşi o parte din colorant în suspensie, care se depune la fund. Trecut ca atare într-un flacon de 1 l., colorantul se lasă să matureze cîteva săptămîni. Lichidul are o culoare purpurie de cireaşă. Înainte de a-l utiliza, porţiunea necesară e filtrată prin hîrtie de filtru.

Frotiurile fixate şi aduse la apă sînt ţinute în acest colorant mai multe ore, chiar şi 12. Colorarea e progresivă. Timpul de colorare e în funcţie de grosimea frotiului, precum şi de concentrarea



Scanned with OKEN Scanner

soluției, întrucît se pot utiliza soluții de colorant diluate încă 50% sau 70% cu lichidul de bază, pentru ca rezultatele să fie mai precise. Firește, cu cît diluția e mai mare, cu atît timpul de colorare e mai lung. E necesară deci o tatonare din partea cercetătorului, care să-i arate cea mai bună concentrare și cel mai favorabil timp de expunere. După colorare lamele se deshidratează, se trec prin xilol și se montează în balsam de Canada (L. Lamy, Ho Thi Sang).

În articolul original din Dapim Refuüm din 1960 (cf. Trop. Dis. Bull., 1961, 58, 148) se arată că lamele colorate se usucă și apoi sînt clarificate în xilol și balsam de Canada. În acest caz nu este necesară deshidratarea. Protozoarele se colorează în negru sau gri-închis, pe un fond gri-deschis. Se colorează bine, atît formele vegetative, cît și chisturile. Baghetele siderofile se colorează foarte intens. Citoplasma *Entamibei coli* se colorează adesea roz. În secțiunile histologice mușchii, keratina și hematiile se colorează roșu (Cohn).

Personal nu avem nici o experiență asupra acestei colorații pe care nu am putut-o realiza din lipsa de negru-clorazol.

**Metoda de colorare pe frotiuri uscate** (Brooke și Goldman). Colorațiile de pînă acum erau realizate pe frotiuri umede. Pentru a putea folosi și frotiuri uscate — care să poată fi colorate mai tîrziu — Brooke și Goldman au preconizat utilizarea alcoolului polivinilic (A.P.V.). Ei adaugă la 93,5 ml din fixatorul Schaudinn (soluție saturată de biclorură de mercur 2 părți și alcool 95° 1 parte), glicerină 1,5 ml și acid acetic glacial 5 ml.

În acest fixator (100 ml) adăugăm acum sub agitație continuă 5 g de alcool polivinilic pulverizat (Ho Thi Sang).

Alcoolul polivinilic e comercializat sub denumirea de *Elvanol*. Se găsește sub mai multe grade de polimerizație și hidroliză. Brooke și Goldman folosesc Elvanol 90—25, fabricat de „E. I. Du Pont de Nemours and Co". În Franța se utilizează produsul Rhodoviol de la Rhône-Poulenc, cu care Ho Thi Sang a obținut rezultate mai puțin satisfăcătoare decît au obținut Brooke și Goldman cu Elvanolul.

Se pune balonul la baie marină la 75°C, pînă ce întreaga pulbere s-a dizolvat. Lăsăm să se răcească. Rezultă un lichid limpede.

Pentru fixarea materialului se amestecă pe capătul unei lame 3 picături din lichidul de mai sus cu o picătură de materii fecale (care poate fi diluată în prealabil, dacă e consistentă). Se întinde în frotiu amestecul rezultat. Se lasă să se usuce 12 ore la temperatura camerei sau 3 ore la 37°C. Frotiurile sînt acuma gata pentru colorare și se păstrează sub această formă un timp îndelungat (cca. o lună). Atunci cînd le vom colora să nu uităm că



Scanned with OKEN Scanner

fixatorul a conținut sublimat, care trebuie eliminat prin alcool 90° iodat (20 min.), după care lama se trece în alcool 50° și apoi în apă. Orice colorant pătrunde prin lacul pe care-l formează alcoolul polivinilic.

Brooke și Goldman arată că în colorațiile cu hematoxilină ferică este permisă uscarea preparatului după fiecare etapă a colorației, fără ca să se altereze ceva, cu excepția însă a deshidratării finale, în cursul căreia nu mai este permisă întreruperea operației și uscarea preparatului.

Întreruperea colorației și uscarea preparatului cîte 3 ore la 37°C poate fi uneori salutară, atunci cînd pojghița cu frotiul are tendința să se încrețească sau să se desprindă în urma menținerii prelungite în soluții apoase. Unele chisturi mai mari pot fi ușor deformate la confecționarea frotiului în cursul uscării pojghiței de alcool polivinilic.

Rozalia Silard, care a lucrat în Laboratorul de parazitologie și patologie generală de la Facultatea de medicină din Djakarta, publică într-un articol din 1963 unele ușoare modificări ale metodei de mai sus de fixare cu A.P.V., observate la cercetătorii indonezieni. Modificările constau în introducerea unei cantități mai mici de alcool polivinilic, adică 4,5%, în loc de 5%, cu utilizarea Elvanolului cu gradul de polimerizare de 71—24. Pe de altă parte, nu se recomandă amestecarea continuă a pulberei de A.P.V. în momentul introducerii ei în lichidul fixator. Se adaugă pulberea, fără a o amesteca prin agitare continuă, se pune după aceea flaconul la încălzire la 75°C și se face agitarea lichidului timp de aproximativ o jumătate de minut, după ce această temperatură a fost atinsă. Pentru confecționarea frotiului se amestecă pe lamă (sau pe lamelă) o picătură de materii fecale cu numai două picături lichid fixator.

Pentru colorare Rozalia Silard preferă coloratia tricromică. Colorantul folosit are formula :

| | | |
|---|---|---|
| Cromotrop 2 R . . . . . | 0,60 | g |
| Verde lumină *(Light green S.F.)* . . . | 0,15 | g |
| Verde durabil *(Fast green F.C.F.)* . . . | 0,15 | g |
| Acid fosfotungstic . . . . . | 0,70 | g |
| Acid acetic glacial . . . . . | 1 | ml |
| Apă distilată . . . . . | 100 | ml |

Pentru preparare se umectează întîi cu acidul acetic substanțele în stare de pulbere și, după ce acțiunea acestuia a avut loc (după 15—30 de min.), se adaugă apa distilată.



Scanned with OKEN Scanner

Metoda de colorare este foarte rapidă. Preparaţia inclusă în pojghiţa de A.P.V. se tratează mai întîi cu tinctură de iod, realizată după formula :

| | |
|---|---|
| Iod metaloid . . . . . | 7 g |
| Iodură de potasiu . . . . | 5 g |
| Alcool etilic 70° . . . . | 100 ml |

Se ţine preparaţia sub acţiunea tincturii de iod un minut.

Se trece apoi prin două băi de alcool 70°, în fiecare cîte un minut, după care este supusă acţiunii colorantului tricrom, 2—4 minute.

Se diferenţiază cîteva secunde cu alcool acidificat cu acid acetic (o picătură de acid glacial la 10 ml alcool 90°).

Se trece apoi prin 2 băi de alcool absolut şi 2 băi de xilol şi se montează în balsam de Canada (Rozalia Silard).

**Colorarea directă între lamă şi lamelă.** Bailenger preconizează următorul reactiv :

| | |
|---|---|
| Cristal violet . . . . . | 2 g |
| Fuxină bazică . . . . . | 0,05 g |
| Alcool 95° . . . . . | 20 ml |
| Fenol cristalizat topit . . | 10 ml |

Amestecul de mai sus se lasă pe masa laboratorului 12 ore, după care i se adaugă :

| | |
|---|---|
| Apă distilată . . . . . | 100 ml |

Se păstrează în flacoane bine închise, la adăpost de lumină. În momentul utilizării se trece prin filtru de hîrtie sau se prelevează cu o pipetă din pătura superioară a lichidului.

Pentru colorare se pune pe o lamă o picătură de materii fecale (sediment de concentrare sau diluţie cu ser fiziologic). Se pune alături o picătură *foarte mică* din reactiv. Se amestecă cele 2 picături cu colţul unei lamele. Se acoperă cu o lamelă şi se examinează. Picătura de colorant fiind foarte mică nu poate realiza o diluare prea mare a materiilor fecale. Pe de altă parte, coloraţia va fi lentă şi progresivă, fără a produce alteraţii în elementele parazitare. Structurile nucleare şi rudimentele flagelare apar în negru, citoplasma şi baghetele siderofile, în roşu (J. Bailenger).

Preparatul se poate păstra cîteva zile, dacă marginile lamelei au fost încercuite cu amestecul lui Rondeau du Noyer, sau, mai simplu, cu un lac pentru unghii.



Scanned with OKEN Scanner

Amestecul lui Rondeau du Noyer (care e mai ieftin) se prepară astfel :

Se pun într-o capsulă 20 g de lanolină. Capsula se așază deasupra unei flăcări. Apa din lanolină se elimină, formînd ca o spumă deasupra. După ce toată apa s-a eliminat se adaugă 80 g colofoniu (sacîz) și se continuă încălzirea pînă la topirea totală a amestecului. Se toarnă fierbinte în cutiuțe de tablă (ca cele de cremă de ghete). Pentru a-l aplica în jurul lamelei se folosește o sîrmă groasă îndoită la un capăt în unghi drept, pe o porțiune de 22 mm (latura unei lamele). Se încălzește la flacără acest capăt îndoit și, cînd e fierbinte, se introduce în amestecul solidificat, care se topește la atingerea lui și învelește cu material lichid acest capăt. Se pune întîi vîrful capătului pe cele 4 colțuri ale lamelei, pentru a o fixa, apoi brațul cudat se aplică în lungul marginilor lamelei — ceea ce închide ermetic spațiul dintre lamă și lamelă, ferind preparatul de desicare.

# Metode speciale în studiul viermilor paraziți Plathelminții

**Metode de fixare.** Fragmente de cestozi de o lungime pînă la 6 cm, sau de trematozi, se pun între 2 lame de microscopie bine curățate. Cele 2 lame sînt apoi înconjurate de un număr de ori și cît mai strîns cu o sfoară subțire, după care sînt cufundate într-un pahar Borrel, în care se găsește un lichid fixator (e foarte bun formolul din comerț, diluat 1/8 în apă). Apa, îmbibînd sfoara, determină o scurtare a ei, care face și mai pronunțată presiunea la care e supus viermele între cele 2 lame. Fixarea începe prin marginile libere ale parazitului și se continuă progresiv, în toată întinderea lui. E un proces lent. Peste 3 zile tăiem sfoara și degajăm parazitul, care se va găsi întins și subțiat prin presiunea suferită. Putem să-l lăsăm încă în fixator una sau două zile, pentru a permite fixatorului să pătrundă bine și prin fețele sale, după



Scanned with OKEN Scanner

care îl supunem la colorare, pentru a scoate în evidenţă organizaţia lui.

Cînd este vorba de segmentele bătrîne de la sfîrşitul strobilei unei tenii, ceea ce ni se cere este precizarea speciei. Precizarea se face în raport cu dispoziţia ramificaţiilor uterine. Pentru punerea lor în evidenţă nu este necesară nici fixarea arătată, nici colorarea, ci numai clarificarea. Aceasta se poate realiza fie cu un amestec în părţi egale de glicerină şi acid acetic, fie cu lactofenolul lui Amann, a cărui formulă este :

| | |
|---|---|
| Fenol cristalizat (alb) . . . | 10 g |
| Acid lactic . . . . . | 10 g |
| Glicerină . . . . . | 20 ml |
| Apă . . . . . | 10 ml |

Se păstrează în flacoane de sticlă de culoare închisă, pentru ca fenolul să nu dea lichidului o culoare roşie.

N. Leon a preconizat utilizarea lactofenolului lui Amann pentru transparentizarea şi studierea în excelente condiţii a ouălor de helminţi, care nu sînt nici umflate, nici deformate de acest lichid.

Preparatele pot fi încercuite cu gumă cu cloral, a cărui formulă este :

| | |
|---|---|
| Hidrat de cloral . . . . . | 50 g |
| Glicerină . . . . . | 20 ml |
| Gumă arabică . . . . . | 30 g |
| Apă distilată . . . . . | 50 ml |

Guma (pulverizată), care se adaugă la urmă, se înveleşte într-o pînză subţire, formînd un pachet care se ţine atîrnat cu o sfoară în mijlocul lichidului alcătuit din celelalte ingrediente. Ea se topeşte lent, ţesutul învelitor servind ca un filtru pentru impurităţile eventuale conţinute.

Un lichid clarificator încă şi mai puternic este cloral-lactofenolul, a cărui formulă este (în greutate, nu în volume) :

| | |
|---|---|
| Hidrat de cloral . . . . . | 2 părţi |
| Fenol cristalizat . . . . . | 1 parte |
| Acid lactic pur . . . . . | 1 parte |

Se încălzesc substanţele de mai sus uşor, într-o capsulă, pînă la lichefiere.



Scanned with OKEN Scanner

**Colorare.** Pentru colorarea cestodelor şi trematodelor, rezultate foarte mulţumitoare se obţin printr-o colorare „in toto" cu carmin (fie carmin alaunat, fie carmin clorhidric sau acetic).

*Carminul alaunat* (colorantul lui Grenacher) se prepară astfel :

— se pune 1 g de carmin fin pulverizat în 100 ml apă distilată ;

— se adaugă 5 g de alaun de potasiu ;

— se fierbe la foc încet 20 min., se lasă să se răcească şi se filtrează prin hîrtie de filtru. Se adaugă un cristal de timol.

Viermii sînt menţinuţi în acest colorant mai multe ore, chiar 24 de ore. Coloraţia este progresivă. După colorare sînt spălaţi în apă, deshidrataţi prin alcooluri, trecuţi în xilol şi în balsam de Canada. Includerea se poate face şi în gelatină glicerinată. În acest caz nu se mai face deshidratarea.

După P. Mayer (în Schmorl), dacă în loc de 1 g de carmin se pun 2 g şi fierberea durează o oră, colorantul devine mai penetrant şi nuanţa obţinută e mai roşie.

*Carminul clorhidric.* Formula sa de preparare este următoarea :

— se pulverizează în mojar 5 g de carmin la care se adaugă 10 ml de acid clorhidric diluat 50% cu apă distilată. Diluarea se face introducînd lent acidul în apă. După ce substanţele de mai sus sînt lăsate o oră ca atare, se adaugă 200 ml alcool 90° ;

— se pune amestecul la fiert, la foc mic, într-un balon astupat cu un dop de plută, în care s-a creat o perforaţie mică, pentru ca în cursul fierberii să se evaporeze cît mai puţin din alcool. Laboratoarele care posedă un refrigerator cu reflux pot să-l folosească în cursul acestei fierberi. Fierberea durează pînă la dizolvarea completă a carminului ;

— se completează apoi la 200 ml cantitatea de alcool, pentru a se înlocui partea dispărută prin evaporare.

Coloraţia cu carminul clorhidric este mult mai rapidă. Se face în general o supracoloraţie, care se regresează prin diferenţiere cu o soluţie de alcool clorhidric (0,5% acid clorhidric în alcool 80°), pînă la obţinerea punctului de coloraţie dorit.

Urmează apoi spălarea prin alcool pur 96°, alcool absolut, xilol şi incluzie în balsam de Canada. Personal preferăm colorarea cu carminul alaunat, care ne-a dat excelente rezultate.

*Carminul acetic al lui Semichon.* Pentru prepararea lui se începe prin a dilua acidul acetic glacial cu un volum egal de apă (se toarnă lent acidul în apă). În acidul acetic diluat astfel 50% se adaugă în exces pulbere de carmin. Se încălzeşte la baie marină, la 95—100°C, timp de 15 min. Se răceşte şi se filtrează prin



Scanned with OKEN Scanner

hîrtie de filtru. Înainte de utilizare se diluează cu un volum egal de alcool 70°.

Pentru colorare se menţine viermele în carminul diluat 50% cu alcool 70°, timp de 1—8 ore (în raport cu mărimea şi grosimea piesei).

Se aruncă colorantul şi se spală piesa de 2 ori cu alcool 70°.

Se diferenţiază cu acid clorhidric 0,5% în alcool 70°.

Se spală de 2—3 ori cu alcool 70°, pentru a înlătura acidul şi a opri diferenţierea.

Se deshidratează în alcool 80° şi 95°.

Se clarifică piesa în creozot sau terpineol.

Se montează în balsam de Canada direct din clarificant sau se mai trece şi prin xilol (Gradwohl).

**Coloraţia lui Bailenger şi Neuzil cu negru formic.** Colorantul se prepară astfel :

| | |
|---|---|
| Negru formic Geigy (negru clorazol) . . . | 5 g |
| Apă distilată . . . . . | 100 ml |
| Acid formic . . . . . | 2 ml |

Se lasă în contact 5 zile, agitîndu-se din timp în timp balonul. Se filtrează. Se utilizează filtratul.

Viermele se colorează o oră şi mai mult, supracolorîndu-se. Se spală în apă distilată şi se diferenţiază în soluţie clorhidrică 0,5% (Bailenger şi Neuzil).

Cum colorantul a fost apos, se poate face includerea, ca şi în cazul coloraţiei cu carmin alaunat, în gelatină glicerinată. Aceasta se prepară astfel :

| | |
|---|---|
| Gelatină . . . . . | 7 g |
| Apă distilată . . . . . | 42 ml |
| Glicerină . . . . . | 50 ml |
| Fenol . . . . . | 1 g |

Se umflă gelatina în apă şi se determină dizolvarea ei prin încălzire la baie marină. Se adaugă în apă glicerina şi apoi fenolul. În momentul utilizării se lichefiază prin încălzire la baia marină. Se pune pe lamă cu o pipetă. Se introduce parazitul în lichid. Se acoperă cu o lamelă şi se aşteaptă închegarea gelatinei. E de dorit ca înainte de includere viermele să fi stat cîtva timp în apă glicerinată şi fenicată, care se lasă să se concentreze prin evaporare la 37°C.



Scanned with OKEN Scanner

**Fixarea.** Este necesară fixarea în extensie, pentru a se putea ulterior urmări mai bine organizaţia. Aceasta se realizează cu alcool 70° fierbinte. Se pun viermii într-un Petri înconjuraţi de cît mai puţină apă, şi se toarnă peste ei alcool 70°, pe care l-am încălzit cu atenţie, pînă aproape de fierbere, adică pînă cînd la fundul balonului au început să se formeze bule.

Pentru clarificarea *nemathelminţilor* se poate utiliza menţinerea lor fie în glicerină, fie în cloral-lactofenol, a cărui formulă de preparare am dat-o mai sus.

# Numărarea elementelor parazitare

Numărarea formelor vegetative, precum şi a chisturilor de protozoare pe cîmpul microscopic, se face în general aproximativ şi se notează cu plusuri, astfel :

| | |
|---|---|
| Foarte rare . . . . . | ± |
| Rare . . . . . | + |
| Frecvente . . . . . | ++ |
| Foarte frecvente . . . . | +++ |
| Extrem de frecvente . . | ++++ |

Ouăle de helminţi pot fi supuse unei numărări mai precise, de care avem nevoie în special atunci cînd testăm efectul unor medicamente antiparazitare. Efectul acestora poate să fie complet şi viermii să dispară în consecinţă cu totul din intestin, ca şi ouăle lor din materiile fecale. Dar efectul poate să fie şi numai parţial : o parte din viermi au dispărut, dar o altă parte, mai mare sau mai mică, rămîne, ceea ce duce la o împuţinare a ouălor susceptibile a fi găsite la un control după tratament.



Scanned with OKEN Scanner

Atragem atenţia asupra fenomenului de încetare temporară de pontă, care poate urma după administrarea unor medicamente. Dar încetarea de pontă nu durează decît cel mult 2—3 săptămîni. În asemenea cazuri numărarea de ouă nu poate avea loc în mod valabil decît după această perioadă şi ea se va face la o lună după tratament. Făcută la timpul potrivit, numărarea de ouă ne va putea preciza ceea ce se numeşte valoarea medicamentului „în intensivitate", adică în ce procent helminţii existenţi au fost atacaţi şi eliminaţi prin tratament.

**Metode de numărare a ouălor de helminţi.** Numărarea trebuie raportată la un anumit element cantitativ fix care, în general, e gramul de materii fecale (sau $cm^3$). Dar intervine şi aici un grad de aproximaţie, întrucît dispersiunea ouălor în masa fecală e departe de a fi uniformă. De aceea e bine ca în prealabil să se amestece la un loc materii recoltate din diferite regiuni ale bolului fecal (din profunzime şi de la suprafaţă), iar numărarea să se facă pe gramul din acest amestec.

Pentru numărare proba de materii fecale supusă controlului trebuie cunoscută cantitativ. Stoll recomanda la început cîntărirea. Ulterior, împreună cu Hausheer, au modificat metoda, utilizînd o măsurare volumetrică în ml, prin deplasarea unui volum de apă corespunzător.

Pentru aceasta se utilizează un flacon special, care are un conţinut de un anumit număr de mililitri. Cel mai obişnuit e flaconul de 60 ml. El are un gît gros şi lung, pe care sînt notate prin linii două niveluri. Linia de jos reprezintă 56 ml, iar cea de deasupra marchează conţinutul de 60 ml. Se introduce lichidul necesar pînă la 56 ml şi se adaugă în el, din masa fecală, cantitatea corespunzătoare pînă ce nivelul lichidului se va urca la linia superioară — adică la 60 ml. În felul acesta am introdus în flacon o cantitate de materii fecale egală cu 4 ml lichid (fig. 21).

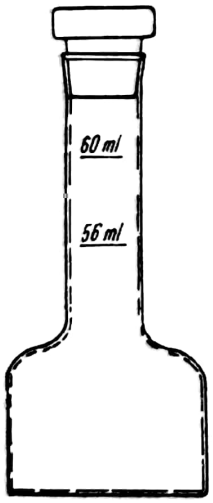



*Fig. 21.* — Flaconul Stoll pentru măsurarea volumetrică a 4 ml materii fecale.

Se poate, la fel, ca balonul să cuprindă la limita superioară 75 ml, iar la cea inferioară 70, deci masa fecală să reprezinte 5 ml.

Lichidul necesar e o soluţie decinormală de hidroxid de sodiu, adică o soluţie 4‰.

În flacon se introduc şi cîteva perle de sticlă. Prin agitarea lor elementele parazitare vor fi împrăştiate cît mai uniform în masa lichidă.



Scanned with OKEN Scanner

Se poate prelungi acţiunea de disociere exercitată de hidroxidul de sodiu asupra materiilor fecale, lăsîndu-se după scurt timp flaconul în repaus în tot cursul zilei şi al nopţii şi procedîndu-se la numărătoare în ziua următoare, cînd operaţia începe prin scuturarea din nou a balonului, pentru răspîndirea cît mai uniformă a ouălor.

Cu o pipetă gradată se extrag imediat după această nouă agitare 0,15 ml lichid, se pun pe o lamă de microscopie, se acoperă cu o lamelă şi se numără cu exactitate, folosind un ocular cu diafragm pătrat (vide infra), numărul de ouă de pe lamă.

Or, 0,15 reprezintă a 400-a parte din întreg lichidul (60 ml). Aşadar, înmulţind numărul de ouă găsit în 0,15 ml cu 400 obţinem numărul de ouă existent în întreaga masă lichidă — deci care a existat în cei 4 ml de materii fecale. Pentru a afla cantitatea pe un singur ml e suficient a împărţi acest produs prin 4 sau mai simplu, a înmulţi cu 100 numărul de ouă găsit în 0,15 ml. La fel se face numărătoarea şi în versiunea în care 5 g de materii (sau 5 ml) sînt introduşi în 75 ml lichid.

Pentru mai multă precizie nu ne vom mulţumi cu numărătoarea ouălor dintr-o singură priză de 0,15 ml. Se fac 3 asemenea preparaţii microscopice, se numără ouăle de pe fiecare preparaţie şi se face astfel media ouălor găsite pe cele 3 preparaţii, număr pe care-l vom înmulţi cu 100.

**Ocularul cu diafragm pătrat.** Am arătat mai sus că pentru numărarea ouălor existente pe preparaţie se foloseşte un ocular cu diafragm pătrat. După cum foarte just observa Langeron, cu diafragmul obişnuit circular al ocularului vor exista zone între cercurile tangente care scapă observaţiei, chiar atunci cînd folosim o platină mobilă, manevrabilă prin şuruburi, pentru a putea plimba cu regularitate preparatul în direcţia dreapta-stînga, înainte-înapoi („platine à charriot"). Dimpotrivă, spaţiul pătrat al cîmpului ocularului nu lasă nici o suprafaţă neexplorată şi nu permite nici o suprafaţă văzută de două ori (fig. 22, 1 şi 2). Diafragmul pătrat poate fi construit de fiecare microscopist, introducînd în ocular o rondelă de carton Bristol (carton de cărţi de vizită) de circumferinţă potrivită şi în care a fost decupat un pătrat ale cărui unghiuri ajung foarte aproape de marginea circumferinţei. Imaginea redată în fig. 22, 3 explică, mai bine decît cuvintele, cele de mai sus (Langeron şi R. du Noyer).

**Metoda F. şi E. Caldwell.** Aceşti autori realizează suspensia materiilor fecale într-o soluţie mai densă şi mai vîscoasă, şi anume într-o soluţie de zahăr de densitatea 1 230. Pentru aceasta ei acţio-



Scanned with OKEN Scanner

nează în 2 timpi. Într-un prim timp se procedează la supunerea materialului fecal la acțiunea unui reactiv mult mai puternic — antiformina — care are un triplu rol : „digeră“ foarte bine materialul fecal, distrugînd părțile sale mucoase, e dezodorizant și germicid.

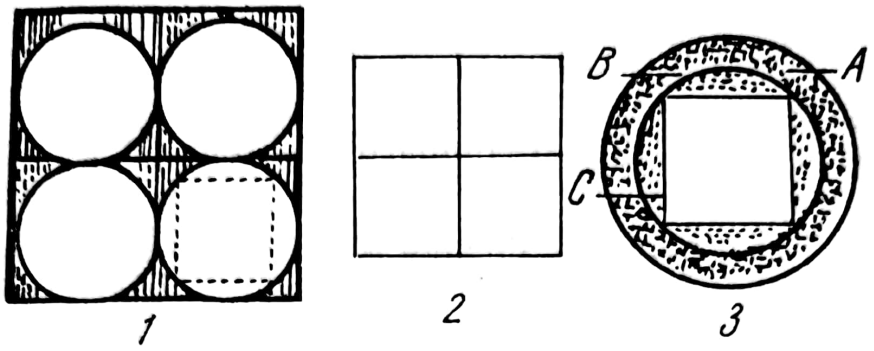



*Fig. 22.* — Rezultate comparate obținute prin : 1 = examen cu ocular cu cîmp circular ; 2 = ocular cu cîmp pătrat ; 3 = diafragm cu deschidere cvadrangulară (după M. Langeron și M. Rondeau du Noyer).

Patru grame de materii fecale, măsurate prin cîntărire prealabilă, sînt triturate cu ajutorul unei baghete de sticlă, într-un balon cotat de 40 ml, cu 4 ml soluție 30% antiformină. Se lasă în contact cel puțin o oră, după care se acoperă amestecul de mai sus cu soluția de zahăr, pînă la linia care marchează 40 ml. Dacă nu dispunem de un balon cotat de 40 ml putem, la rigoare, considera 1 g de materii fecale ca echivalent cu 1 ml apă și adăuga, peste amestecul de materii fecale și antiformină, 32 ml soluție zaharată.

Se realizează astfel o diluție a materialului fecal 1/10.

Soluția de zahăr se prepară dizolvînd 750 g zahăr de trestie (zahăr Candi) în 1 000 ml apă de robinet. Se ridică temperatura pînă la punctul de fierbere, pentru a grăbi dizolvarea.

Dispersarea ouălor în soluția zaharată nu se face prin scuturarea flaconului, ci prin barbotare prin bule de aer, pe care le provocăm prin suflarea dintr-o pipetă introdusă pînă în fundul flaconului. După uniformizarea dispersiei elementelor parazitare se extrage, cu o pipetă, cantitatea de 0,1 ml, care va reprezenta o sutime de gram din materialul fecal și, în consecință, numărul de ouă găsit în 0,1 ml trebuie înmulțit cu 100, pentru a găsi cantitatea de ouă pe gramul de materii fecale.



Scanned with OKEN Scanner

Picătura de lichid sustrasă cu pipeta e întinsă pe o lamă în forma unui pătrat sau unui dreptunghi. Dacă în ea sînt prea multe debriuri fecale, care întunecă preparaţia, aceasta poate fi clarificată prin adăugarea unei picături din soluţia zaharată din stocul cu care s-a realizat proba. Nu este necesară punerea deasupra a unei lamele. Soluţia de zahăr nu cristalizează, se întinde uniform, se usucă greu şi permite cu uşurinţă găsirea ouălor care se ridică, din cauza densităţii soluţiei, pe planul cel mai superficial al ei. Pentru ouăle alterate care rămîn pe un plan inferior e necesar să intervenim pentru o nouă punere la punct cu viza micrometrică.

**Metoda Zschucke.** După ce fusese publicată metoda Stoll, Stoll şi Hausheer au găsit că 0,15 ml reprezintă o picătură prea mare, în care o cantitate mare de ouă de viermi e dificil şi obositor de numărat, şi au redus picătura la 0,075 ml, adică la jumătate. Bineînţeles, coeficientul de înmulţire — pentru a afla în acest caz numărul de ouă pe gram sau pe $cm^3$ — ar fi 200, în loc de 100.

Johannes Zschucke (1931) găseşte că numărarea de ouă chiar într-o picătură de 0,075 ml poate fi extrem de obositoare, atunci cînd e vorba de o parazitare intensă. Potrivit acestui autor, e mai susceptibil, ca acela care lucrează încordat pentru a număra cîmpul întreg, să greşească prin scăpări de atenţie, decît acela care se mulţumeşte a număra ouăle numai pe o porţiune a cîmpului şi va înmulţi apoi cifra găsită pe această porţiune cu un coeficient care să corespundă restului din cîmp, încă neexplorat. Prima condiţie pentru acest deziderat e aceea a răspîndirii cît mai uniforme a elementelor parazitare pe suprafaţa cîmpului de cercetat. Zschucke construieşte o cameră specială de numărare, asemănătoare în principiu, cu camera Bürker, utilizată pentru numărarea hematiilor. Camera lui Zschucke cuprinde exact 0,075 ml lichid — adică aceeaşi cantitate ca în picătura mică a lui Stoll şi Hausheer. Cîmpul de numărare e împărţit în 15 pătrate mari, cu latura de 5 mm. La rîndul său, fiecare pătrat mare e divizat, prin linii mai subţiri, în 100 de pătrăţele cu latura de 0,5 mm. Cele 15 pătrate mari sînt dispuse în 5 coloane alăturate, fiecare avînd cîte 3 asemenea pătrate mari. Camera e acoperită cu o lamelă solidă, menţinută prin ajutorul a două cleme metalice laterale, ca şi la camera Bürker. Pentru numărare se procedează astfel :

— se execută procedeul Stoll şi Hausheer, pînă la recoltarea picăturii în care se vor număra ouăle ;

— se aşază lamela pe cameră, sub menţinerea solidă prin cele două cleme laterale. Sticlăria, camera şi lamela care o acoperă vor fi fost în prealabil bine degresate ;



Scanned with OKEN Scanner

— se ia o picătură din diluţia Stoll cu o pipetă, de data aceasta negradată, şi se lasă să pătrundă în cameră prin capilaritate. Dacă sticlăria a fost bine degrasată va fi evitată orice bulă de aer, iar conţinutul lichidului care va intra şi rămîne în camera Zschucke va fi exact de 0,075 ml (fig. 23).

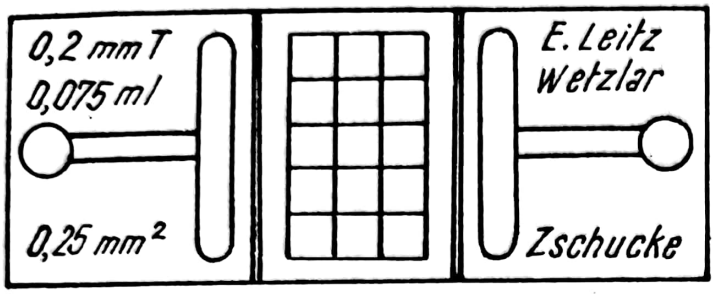



*Fig. 23.* — Camera Zschucke.

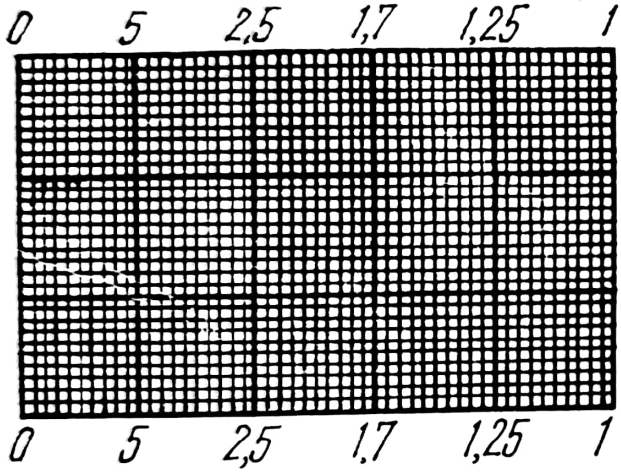



*Fig. 24.* — Cadrilajul camerei Zschucke.

Se numără ouăle existente, dar nu pe întreaga suprafaţă a celor 15 pătrate mari, ci numai pe 2 sau 3 coloane verticale, adică pe 6 sau 9 pătrate, şi se înmulţeşte cifra găsită cu un coeficient corespunzător suprafeţei rămase neexplorate. Acest coeficient e notat în capul fiecărei coloane verticale de pătrate mari. Dacă, spre exemplu, s-au numărat 6 pătrate, rămîn încă necercetate 9 pătrate şi coeficientul va fi de 2,5, adică încă o dată şi jumătate cifra găsită. E de fapt acelaşi mod în care se procedează şi la numărarea hematiilor, numărare care nu se face pe întreaga suprafaţă a camerei Bürker, ci numai pe o porţiune a ei. Cifra găsită după înmulţirea cu coeficientul respectiv va fi apoi înmulţită cu 200, pentru a obţine numărul de ouă pe gramul de materii fecale sau pe $cm^3$ (fig. 24).

Potrivit părerii lui Zschucke, prin camera de numărare pe care a propus-o se scade osteneala cercetătorului, se scade timpul necesar pentru numărare, fără a diminua valoarea rezultatelor obţinute. În experienţa comparativă a acestui autor, prin numărarea în camera propusă numărul de ouă apare mai ridicat faţă de acela obţinut prin numărarea ouălor de pe întreaga picătură de 0,075 ml, obţinută prin prelevare cu o pipetă specială după procedeul Stoll.

**Metoda Hung.** Acest autor a propus realizarea unui recipient circular, în fundul căruia e creată, prin înfundare o cupulă de o capacitate care reprezintă cantitatea unui gram de materii fecale (fig. 25). Se procedează în modul următor :



Scanned with OKEN Scanner

1. se măsoară cantitatea de 1 g materii fecale prin introducerea lor în această înfundătură ;

2. se pune la început, picătură cu picătură, apoi în cantităţi tot mai mari şi sub continuă agitare cu o baghetă pentru o bună emulsionare a masei fecale, o soluţie saturată de clorură de sodiu ;

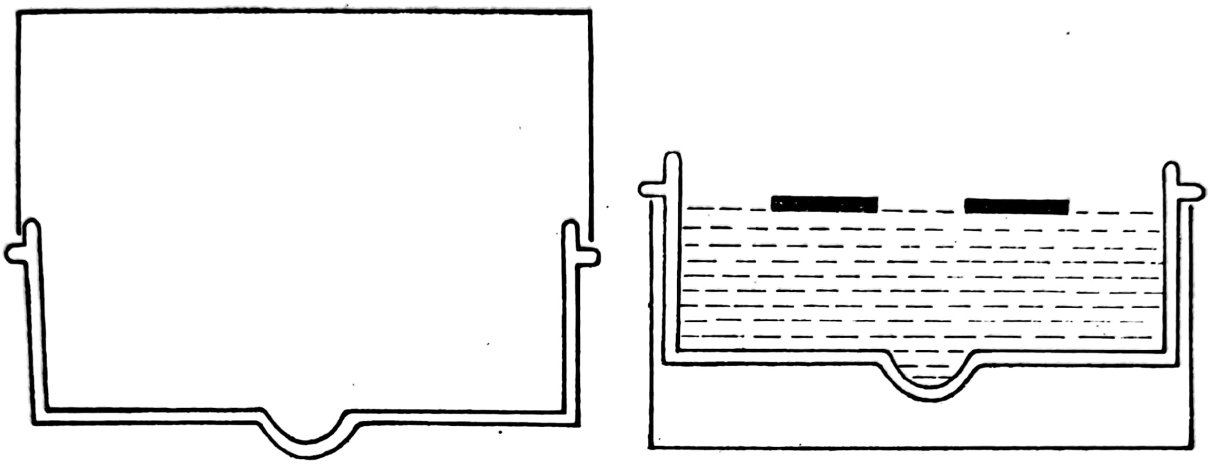


*Fig. 25.* — Aparatul Hung (în secţiune). În stînga, în repaus, acoperit cu capacul său. În dreapta, în utilizare. Capacul serveşte ca un suport al aparatului. La suprafaţa lichidului salin plutesc 2 lamele.

3. recipientul, a cărui capacitate este de aproximativ 40 ml, se umple cu soluţia salină ;

4. la suprafaţa soluţiei se aşază să plutească 3 lamele, în general de 18 × 18 (eventual şi alte dimensiuni) ;

5. ouăle se ridică la suprafaţă şi se lipesc de lamelele respective ;

6. după 30—40 de min, se ridică lamelele menţinute în aceeaşi poziţie cu o pensă anatomică, şi se aşază cu faţa care a fost în contact cu lichidul salin pe cîte o lamă de microscopie, pentru a se putea număra ouăle care au aderat pe ele ;

7. se face media de ouă pe lamelă ;fie N acest număr de ouă ;

8. se calculează raportul dintre suprafaţa totală a recipientului şi suprafaţa lamelei astfel : dacă pe o lamelă de 18 $mm^2$ se găsesc N ouă, pe întreaga suprafaţă ($\pi R^2$) se vor găsi :

$$\frac{\pi R^2 \times N}{18^2}$$

Pentru a obţine un rezultat mai exact, se recomandă următoarele ajustări (în M. Langeron) :

— sub 300 de ouă cifra rămîne ca atare ;



Scanned with OKEN Scanner

— între 300—500 de ouă se adaugă 1/14 ;
— între 500—650 de ouă se adaugă 1/5 ;
— peste 650 de ouă se adaugă 1/3 din cifra găsită.

Pe cîtă vreme metodele de numărare descrise pînă acum se raportau în mod direct și nemijlocit la cantitatea de ouă prezente într-o anumită diluție, metoda Hung face apel la un factor supra-adăugat, acela al capacității ouălor de a flota, la aderarea lor la un suport de sticlă, aderare care poate înceta după un anumit timp, prin îngreuierea ouălor. E vorba dar de reflectarea cantitativă a anumitor însușiri calitative. Pe lîngă aceasta ea nu poate fi aplicată decît la ouăle ușoare, ca acelea de *Ankylostomidae* — pentru care, de altfel, a și fost creată. Tocmai prin caracterul de reflectare arătat ca și prin aceea că nu se raportează la orice categorie de ouă, o socotim mai puțin adecvată muncii de rutină într-un laborator de analize și nici nu am fi citat-o dacă nu ar fi reprezentat originea denumirii de „Willis-Hung", pe care am dat-o aplicării ei nu în scop cantitativ, ci în scop calitativ, pentru care e excelentă. Hung are marele merit de a fi înlocuit sticlele mari, cu care se acopereau borcanele pentru realizarea metodei Willis, cu lamele, care să plutească la suprafața lichidului salin. Metoda Willis-Hung, utilizată în scopul descoperirii de ouă, și-a cîștigat azi un loc important în analizele de rutină ale tuturor laboratoarelor de parazitologie.

**Metoda Brumpt.** Se cîntăresc 1—5 g de materii fecale. Se diluează aceste materii în proporție de 1 la 10 sau chiar 1 la 20 (în raport cu consistența lor) cu o soluție decinormală de hidroxid de sodiu (4‰) sau, la rigoare, chiar cu simplă apă de robinet. Diluția poate fi supusă tamizării, pentru a o debarasa de debriuri grosolane.

Se aspiră cu o pipetă gradată 1 ml din diluție și se numără picăturile conținute în acest mililitru pe care le lăsăm să cadă într-o chiuvetă. Una sau două din aceste picături sînt puse pe o lamă, se acoperă cu lamele și se numără ouăle găsite la examenul microscopic. Această operație se poate repeta cu mai multe picături, pentru a stabili o medie pe picătură. Numărul de ouă pe picătură înmulțit cu numărul de picături pe mililitru va da numărul de ouă pe mililitru de diluție. Pentru a afla numărul de ouă pe gramul de materii fecale nu ne rămîne decît a înmulți produsul găsit cu cifra diluției, adică cu 10, dacă diluția a fost de 1 la 10, sau cu 20, dacă a fost de 1 la 20.

Dintre toate metodele expuse pentru numărarea ouălor de helminți, metoda Brumpt apare ca cea mai simplă, deoarece nu necesită nici o aparatură, și cea mai ușor de realizat. Pentru aceste



Scanned with OKEN Scanner

motive o recomandăm în munca de rutină a laboratoarelor de parazitologie.

**Ajustarea cifrei reprezentînd numărul de ouă la consistenţa materiilor fecale.** Aceeaşi persoană, posedînd acelaşi număr de viermi, poate avea, la 2 momente deosebite, scaune de o consistenţă total deosebită — de la scaune dure, dense, de mare constipaţie, la scaune moi „en buse de vache" şi la scaune diareice sau chiar foarte apoase. Or, numărul de ouă pe gram sau pe ml în toate aceste posibilităţi va varia în raport cu consistenţa scaunelor. De aceea s-a cerut să se corecteze cifra numărului de ouă rezultat, prin oricare din metodele utilizate, cu un coeficient care să reprezinte consistenţa materiilor. Dar, după cum cu drept cuvînt observă Zschucke, nu există acord între autori asupra acestui coeficient. Cort, Otto şi Spindler, citaţi de Zschucke, sînt de părere să multiplicăm cifrele găsite cu 1,5 cînd e vorba de un scaun format şi moale, cu 2 cînd e vorba de un scaun moale, neformat, cu 3 la un scaun diareic şi cu 4 la un scaun apos. Pentru un scaun format şi tare cifra găsită va rămîne nemodificată.

## Desenarea imaginilor microscopice ale elementelor parazitare

Este uneori necesară desenarea imaginilor diverselor formaţii supuse examenului microscopic, pentru a consemna pe hîrtie unele aspecte particulare ale lor.

Desenul poate fi făcut cu ochiul liber, reproducînd pe hîrtie, cu un creion, imaginea pe care o prezintă microscopul. Dar pentru un bun desen e necesar a poseda puţin talent şi aplicaţie. Altminteri, imaginea pe care o reproducem poate fi falsă şi neutilizabilă.

**Cadrilajul lui R. Bazin.** O ameliorare sensibilă a posibilităţii de a realiza un desen corect a fost adusă de cadrilajul ocular al



Scanned with OKEN Scanner

lui R. Bazin (fig. 26). Este vorba de o lamelă rotundă, din sticlă subţire — de un diametru egal cu acela interior al ocularului. Lamela se introduce în ocular. Pe ea se găseşte desenat un cadrilaj mărunt, prin gravură sau prin linii fine trase cu tuş. Imaginea preparatului microscopic va fi văzută prin reţeaua de pătrăţele pe care se suprapune, iar contururile desenului nostru vor fi

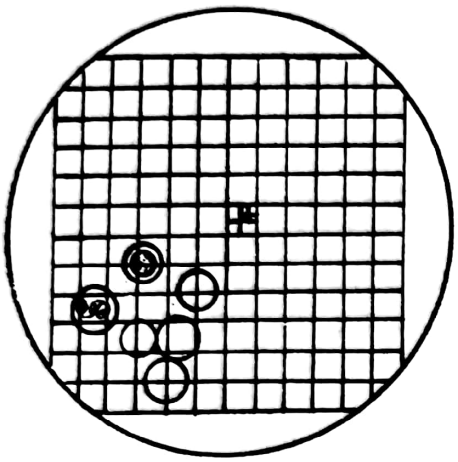


*Fig. 26.* — Cadrilajul ocular al lui R. Bazin (în M. Langeron).

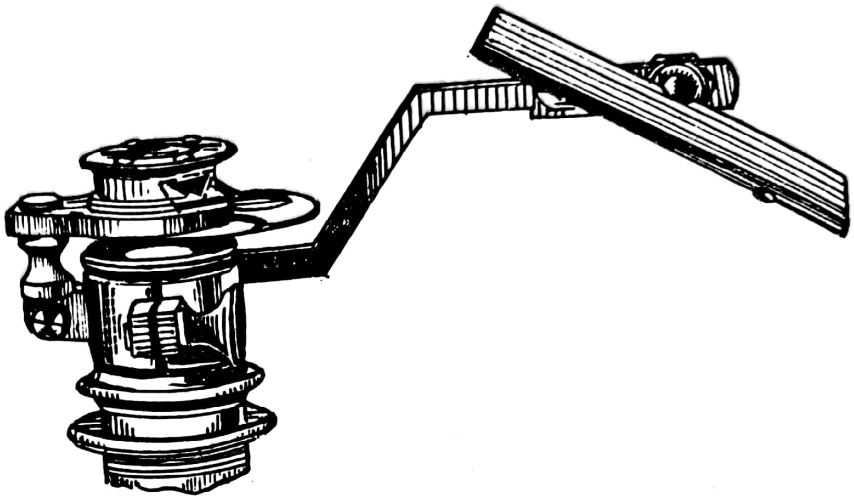


*Fig. 27.* — Camera clară cu oglindă, model Reichert.

trase pe o hîrtie cadrilată. Fiecare linie va fi raportată la situaţia ei faţă de pătrăţelele din ocular. E acelaşi procedeu pe care-l întrebuinţează copiii cînd reproduc hărţi geografice. Desenul nostru va fi astfel foarte aproape de realitate, bazat pe aceste repere.

Dar un desen cît mai corect se poate realiza printr-un aparat special de desen la microscop. Există două tipuri de aparate de desenat imaginile la microscop. Unele poartă numele de „cameră clară", iar celelalte, de „aparat de desenat". Această distincţie, care se păstrează încă în unele cărţi, reprezintă o subtilitate de care ne putem dispensa, denumind toate aparatele de desenat la microscop, fie că folosesc în întregime fasciculul de lumină, fie că folosesc numai jumătate din el, cu numele de cameră clară, nume care a prevalat în practica de rutină. Orice aparat care contopeşte în ochii observatorului imaginea pe care o dă ocularul microscopului, cu imaginea vîrfului creionului, care se mişcă pe hîrtia de desenat aşezată alături de microscop, poate fi denumit „cameră clară". Unele camere clare nu posedă decît un joc de prisme. Altele posedă, pe lîngă prismele din corpul aparatului, o oglindă pe care se reflectă imaginea pe care o constituim pe hîrtie (fig. 27). Aceste din urmă tipuri de aparate le socotim ca cele mai practice şi vom cita între ele pe acela pe care îl utilizăm noi în mod curent, fabricat de firma Reichert al cărui mod de funcţionare e reprodus



Scanned with OKEN Scanner

schematic în figura 28. Se vede pe această figură cum în ochiul observatorului se contopesc imaginea pe care o dă ocularul, cu aceea de pe hîrtie. Raza de lumină de pe hîrtie se reflectă în oglindă şi, ajungînd la prisma din corpul aparatului se reflectă încă o dată şi ajunge astfel în ochiul observatorului. Această rază duce la ochi imaginea vîrfului creionului cu care desenăm şi ne permite conducerea acestui vîrf pe urmele liniilor imaginii din microscop.

O cameră clară bine aşezată dă reproduceri corecte care, de multe ori, depăşesc ceea ce se poate realiza ca document ştiinţific prin microfotografie. Într-adevăr microfotografia, oricît de bine ar fi făcută, nu poate cuprinde decît un singur şi anumit plan, pe cîtă vreme o imagine desenată după observarea mai multor planuri micrometrice reprezintă o sinteză a acestor multiple secţiuni optice şi lasă loc şi contribuţiei personale a observatorului însuşi, care execută această sinteză. Deviind minimal cu ceva de la fiecare din secţiunile optice observate, imaginea va fi în acelaşi timp mai completă şi mai utilă, tocmai prin această sinteză. Pe de altă parte, desenarea unui preparat ne sileşte să-l observăm mai bine şi să prindem detalii care ar fi putut trece neobservate.

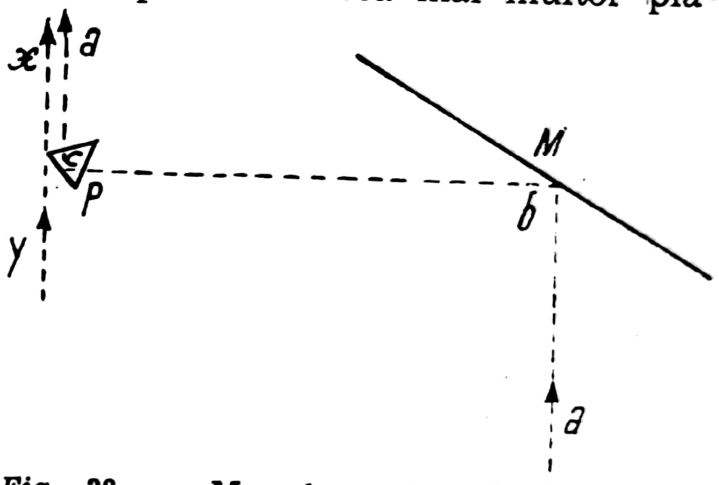



*Fig. 28.* — Mersul razelor de lumină în camera clară cu oglindă Reichert (după M. Langeron).

Pentru a putea executa un desen la camera clară în bune condiţii se cere, în primul rînd, ca lumina din microscop să fie egală cu aceea a hîrtiei pe care reproducem imaginea. Dacă lumina microscopului e mai mare, vom vedea bine preparatul, dar nu vom vedea bine vîrful creionului. Dacă luminarea hîrtiei pe care desenăm o întrece pe aceea a microscopului vom vedea foarte bine vîrful creionului, dar foarte confuz imaginea preparatului pe care vrem să-l reproducem. Această egalizare a luminii se poate realiza atît prin variaţii ale iluminării hîrtiei, cît şi prin interpunerea în dreptul razei de lumină care vine de pe hîrtie, a unor discuri obscure — de o obscuritate treptat variată. Filtrînd lumina care vine de la hîrtie discurile obscure o micşorează cu diferite grade. Toate aparatele de desenat posedă un joc de asemenea discuri întunecate, aşezate pe un cerc care se învîrteşte pe corpul



Scanned with OKEN Scanner

aparatului. Lumina microscopului poate fi, la rîndul ei, modificată prin jocul diafragmei şi al condensatorului şi introducerea sub condensator de filtre întunecate.

Pe de altă parte, aparatul de desenat care se ataşează deasupra ocularului trebuie situat la o înălţime potrivită faţă de ocular, pentru a fi utilizate toate razele luminoase ale microscopului şi a avea un cîmp luminat cît mai larg. Această distanţă o fixăm uşor prin tatonare.

Oglinda aparatului se aşază în dreapta, pentru ca imaginea pe care o desenăm să fie la îndemîna mîinii drepte, în timp ce prin ocularul microscopului privim cu ochiul stîng. Oglinda trebuie să fie aşezată înclinată la 45°, ceea ce la multe aparate, ca la aparatul Reichert, e stabilit printr-o opritoare automată. Hîrtia pe care desenăm va fi în aceste condiţii aşezată pe un plan orizontal.

Pentru a ne da seama că aparatul a fost bine aranjat şi că imaginea nu a suferit nici o deviaţie din cauza unei reflectări defectuoase a razelor luminoase, e bine să punem pe hîrtia de desenat înainte de a executa desenul — un ocular de microscop sau un corp cilindric oarecare. El trebuie să apară vertical cînd este privit prin ocularul microscopului. Dacă apare înclinat, imaginea pe care o desenăm nu va fi corectă.

Coincidenţa celor două imagini, aceea din microscop şi aceea de pe hîrtie, trebuie să se realizeze privindu-le de la o aceeaşi distanţă. Cum imaginea din microscop e la circa 25 cm de ochiul observatorului, e de dorit ca şi raza de lumină care porneşte de la hîrtie şi după două reflectări ajunge la ochiul observatorului, să aibă o lungime asemănătoare. Altminteri, munca de acomodare a ochiului pentru aceste 2 distanţe diferite reprezintă o cauză de oboseală, care se resimte la desenele care durează un timp mai îndelungat. Pentru aceasta unii observatori ridică planul pe care se execută desenul prin suprapunere de cărţi sau alte obiecte, pînă la nivelul platinei microscopului. Totuşi, această precauţie nu e absolut necesară şi personal am putut executa în bune condiţii desene la camera clară, pe planul mesei pe care era aşezat microscopul.

În sfîrşit, pentru realizarea unui desen corect trebuie utilizat un creion bine ascuţit, cu vîrful foarte subţire şi lung, pentru a putea urmări contururile cele mai fine ale imaginii. E bine să se utilizeze o mină de duritate medie.

Aparatul de desenat, fixat la ocularul microscopului, poate fi cu uşurinţă dat la o parte din cînd în cînd, prin jocul unei mici balamale. Această acţiune ne este utilă în timpul executării desenu-



Scanned with OKEN Scanner

lui, întrucît imaginea, oricît de clară ar apărea văzută prin mijlocirea aparatului, va căpăta o claritate încă şi mai mare în lipsa acestuia. De aceea, pentru precizarea unor detalii care pot scăpa la privirea preparatului prin aparat este bine ca, după ce mai întîi am fixat pe hîrtie principalele repere, să adăugăm cu ochiul liber pe imagine acele mici detalii pe care le vedem mai bine direct prin ocular, după ce am ridicat temporar aparatul de deasupra microscopului.

Camerele clare fără oglindă se bazează pe reflectarea razelor de lumină care pornesc de pe planşeta pe care desenăm numai prin 2 prisme, din care în general una mai mare, situată spre desen, şi una mai mică, situată spre ochiul observatorului. Aceste 2 prisme pot avea suprafeţele reflectante paralele şi înclinate la 45°. La alte modele însă, suprafeţele reflectante ale celor 2 prisme nu sînt paralele. În acest caz raza de lumină, pornind de la desen, va fi oblică şi vom fi atunci nevoiţi, pentru a evita o deformare a imaginii, să desenăm pe un plan înclinat, şi anume de o înclinare în raport cu oblicitatea razelor de lumină care totdeauna trebuie să pornească perpendicular de pe planul desenului. Dacă înclinarea e corectă, un tub cilindric (un ocular) aşezat pe acest

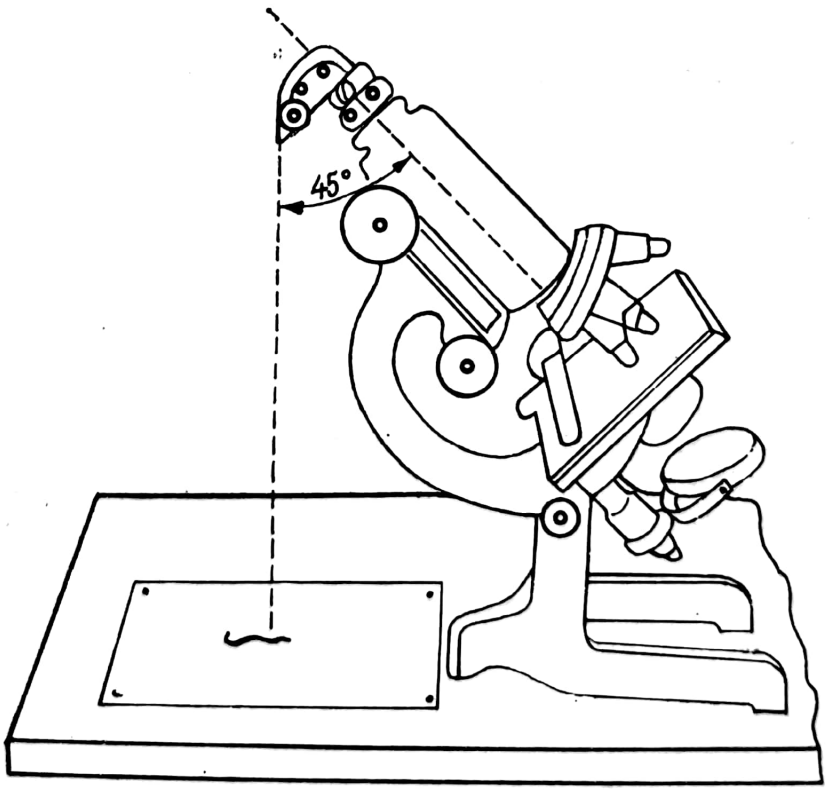



*Fig. 29.* — Microscop înclinat la 45° pentru camera clară Malassez (în M. Langeron).



Scanned with OKEN Scanner

plan şi privit prin ocularul microscopului va apare vertical şi nu înclinat.

În cazul în care cele 2 prisme pot fi aranjate una faţă de alta în aşa fel ca oblicitatea razei de lumină care porneşte de la desen să fie de 45°, în loc de a desena pe un plan înclinat de 45° — putem înclina la 45° microscopul. Aparatul va fi atunci aşezat cu prisma cea mare îndărăt, spre observator. Oblicitatea razei de lumină va fi compensată prin oblicitatea tubului microscopului şi raza va urca vertical de pe planul desenului (fig. 29). Planşeta va fi instalată nu ca de obicei la dreapta microscopului, ci în spatele său — pe un plan orizontal — ceea ce este mult mai comod. Felul de funcţionare şi de aranjare a diferitelor camere clare variază în raport cu construcţia lor şi este în general indicată de fabricantul respectiv.

## Măsurarea elementelor parazitare

Nu este de ajuns să figurăm corect într-un desen imaginea elementelor parazitare care ni se par a prezenta un interes deosebit. Este necesară şi măsurarea lor — care în general se face în microni. Un micron este o miime de milimetru şi se notează cu litera elenă $\mu$ (miu).

Cea mai simplă metodă — dar şi cea mai aproximativă — este compararea ca mărime, cînd este cu putinţă, a obiectului respectiv cu un altul pe care îl cunoaştem dinainte : spre exemplu cu o hematie, cu un leucocit eozinofil, cu un anumit ou de vierme. Dar acel obiect de referinţă trebuie să se găsească în acelaşi cîmp microscopic. Reţinerea în memorie a dimensiunilor lui în sistemul optic cu care lucrăm dă o aproximaţie prea mare şi nu reprezintă un bun sistem de lucru.



Scanned with OKEN Scanner

De ajutor ne poate fi ocularul cadrilat al lui R. Bazin, despre care am pomenit şi în capitolul precedent. Anumite elemente de dimensiuni cunoscute au putut fi apreciate ca mărime faţă de pătrăţelele acelui cadrilaj. Cu acelaşi sistem optic, aceleaşi pătrăţele vor putea servi acum pentru aprecierea mărimii elementului nou. Pentru aceasta însă e necesar să alegem ca elemente de referinţă elemente bine cunoscute, cu o dimensiune fixă. Compararea cu elemente care, ele însele, sînt variabile în anumite limite — transpune şi noului element o aproximaţie corespunzătoare.

Pentru aceasta e mai bine să facem aprecierea măsurii elementelor noi prin referinţă directă la anumite date de măsură din sistemul milimetric.

De aceea în locul cadrilajului Bazin, pe care în general nici nu îl avem la îndemînă, putem utiliza un aparat mai uşor de găsit — „micrometru ocular“ — pe care îl etalonăm în prealabil cu diviziunea în microni a unui micrometru obiectiv. Micrometrul ocular are asupra ocularului cadrilat şi avantajul de a avea diviziuni mult mai mici.

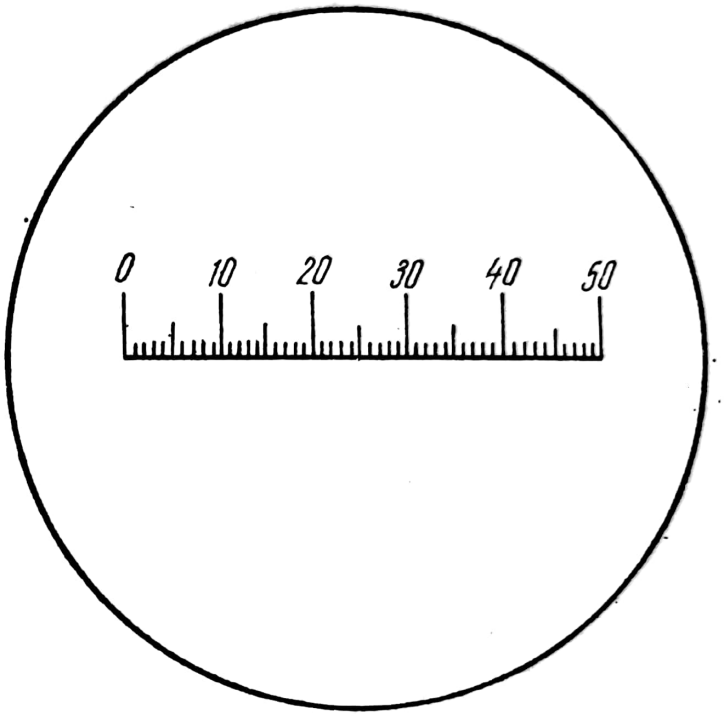


*Fig. 30.* — Micrometru ocular.

**Măsurarea cu micrometrul ocular.** Acest aparat este o simplă rondelă de sticlă, care se introduce în ocular (fig. 30). Pe mijlocul ei este gravată o scară milimetrică (0,5 cm divizat în 50 sau 1 cm divizat în 100). Rondela trebuie aşezată în ocular cu faţa gradată în jos, spre obiectiv. Rămîne acuma să stabilim pentru un anumit sistem optic la cîţi microni corespunde fiecare diviziune a ocularului.

Pentru aceasta se foloseşte un „micrometru obiectiv“ — reprezentat printr-o lamă de microscopie anume construită, pe faţa superioară a căreia, la mijloc, este gravată o scară milimetrică: un milimetru împărţit în 100 de diviziuni. Fiecare diviziune va avea deci 10 microni.

Privind aceste diviziuni cu un anumit sistem optic (un anumit ocular, un anumit obiectiv, o anumită lungime a tubului mi-



Scanned with OKEN Scanner

croscopului), facem aşa ca să se alăture scara de pe ocular de aceea de pe obiectiv şi, pe cît posibil, liniile gravate să corespundă. În aceste condiţii observăm cîte diviziuni ale micrometrului ocular se suprapun exact ca distanţă pe cîte diviziuni ale micrometrului obiectiv. Pentru o cît mai mare exactitate şi ţinînd seama de faptul că trăsăturile gravate pe micrometru obiectiv — în special cînd sînt privite ca obiective puternice — apar ca linii groase faţă de cele ale micrometrului ocular, trebuie să stabilim un anumit fel de coincidenţă a liniilor mai subţiri ale micrometrului ocular cu liniile mai groase ale micrometrului obiectiv : spre exemplu, exact la mijlocul grosimii liniilor micrometrului obiectiv sau, mai bine, să se facă coincidenţa cu marginile superioare sau inferioare ale liniilor acestui din urmă micrometru.

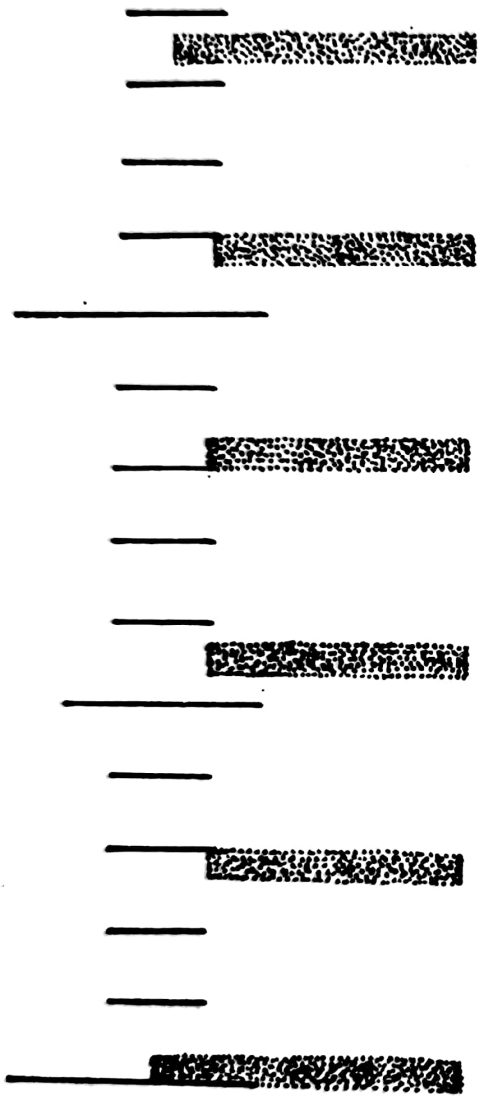


*Fig. 31.* — Confruntarea diviziunilor micrometrului ocular cu acelea ale micrometrului obiectiv. În exemplul de faţă 8 diviziuni ale micrometrului ocular corespund la 3 diviziuni ale micrometrului obiectiv.

Fie X numărul diviziunilor de pe micrometrul ocular, care se suprapun exact pe *N*, numărul diviziunilor micrometrului obiectiv : transformăm întîi pe *N* în microni, înmulţindu-l cu 10, şi împărţim pe N × 10 prin X.

Dacă, spre exemplu N a fost egal cu 3, iar X cu 8, înseamnă că 8 diviziuni ale micrometrului ocular corespund la 30 de microni, iar o diviziune va corespunde la 30 : 8 = 3,75 microni (fig. 31).

Rezultatul nu este firește valabil decît pentru un anumit sistem optic şi pentru fiecare alt sistem optic cu care lucrăm vom stabili constante de mărime a diviziunilor micrometrului ocular sau „coeficientul micrometric". Operaţia se face o dată pentru totdeauna şi coeficientul micrometric pentru fiecare sistem optic va fi notat pe o tabelă, care o introducem în cutia microscopului.

Pentru a cunoaşte mărimea elementului nou nu ne rămîne decît să-l mă-



Scanned with OKEN Scanner

surăm cu diviziunile micrometrului ocular, fie întorcînd micrometrul prin rotaţia ocularului pentru a-l alătura de imaginea elementului nou, fie mişcînd odată cu platina microscopului, elementul cel nou, pentru a-l alătura de deviziunile micrometrului ocular. Numărul de diviziuni corespunzător elementului nou va fi înmulţit cu coeficientul micrometric cunoscut, pentru a afla dimensiunile în microni ale acestui nou element.

*Fig. 32.* — Micrometrul ocular Gebhardt (în M. Langeron).

Măsurarea elementelor parazitare cu micrometrul ocular în felul arătat — dă rezultate suficient de exacte pentru practica de rutină şi nu socotim necesară recurgerea la diverse perfecţionări ale metodei, ca spre exemplu, aceea adusă de Gebhardt, de înlocuire a scării micrometrice de pe ocular cu imaginea unui lanţ de pătrăţele care se unesc prin unul din unghiurile lor. Este, într-adevăr, vorba de o perfecţionare, întrucît ne permite să apreciem mai bine subdiviziunile distanţelor între pătrăţele, dar pentru munca de rutină această perfecţionare nu apare necesară. Scara micrometrică a lui Gebhardt de altfel nici nu se găseşte de obicei în trusa de care dispune microscopistul (fig. 32).

**Măsurarea cu ajutorul camerei clare.** Este metoda pe care noi înşine am utilizat-o de cele mai multe ori. Ea constă în a executa la camera clară un desen al obiectului care ne interesează şi, păstrînd acelaşi sistem optic — în exact aceleaşi condiţiuni ale planului pe care desenăm — a înlocui preparatul desenat cu un micrometru obiectiv. Vom desena imaginea acestuia alături de aceea a obiectului pe care îl vom măsura. Cînd e vorba de utilizarea unui obiectiv puternic, liniile micrometrului obiectiv apar foarte groase şi trăsăturile în creion prin care îl reprezentăm trebuie să se raporteze la o poziţie analogă faţă de liniile respective. Pe de altă parte, ne vom mulţumi cu reproducerea porţiunii din micrometrul obiectiv care apare în centrul cîmpului microscopic, pentru a evita unele deformări care se produc spre periferia cîmpului. Este suficient la măririle mari să reprezentăm lungimea



Scanned with OKEN Scanner

de 50 microni — adică 5 diviziuni. La mărimile mai mici vom reprezenta 100 microni (10 diviziuni).

Este o cerință curentă ca orice imagine obținută prin camera clară să poarte alături și scara micrometrică (de 50 sau 100 microni), care să ne permită a aprecia dimensiunile diferitelor părți ale desenului realizat.

Pentru măsurare reproducem cu creionul pe marginea unei bandelete de carton bristol scara micrometrică prin alăturare cu imaginea ei. Cu această scară reprodusă măsurăm apoi toate dimensiunile care ne interesează. Fiecare diviziune a scării va reprezenta 10 microni.

Se poate obține o precizare mai mare, în unități de un micron, fie prin simplă aproximație vizuală (ceea ce în munca de rutină parazitologică e suficient), fie prin construirea unei abace, ca aceea pe care o propune M. Langeron și care se face în modul următor : se desenează pe hîrtie un dreptunghi, a cărui înălțime va fi egală cu distanța care reprezintă 10 microni (o diviziune a scării micrometrice). Lungimea dreptunghiului va fi de 10 ori mai mare. Dreptunghiul va fi împărțit în 10 pătrate egale, prin 9 linii perpendiculare. Se trage apoi o diagonală care merge de la unghiul inferior stîng la unghiul superior drept. Această diagonală taie cele 9 perpendiculare (coordonate) la distanțe din ce în ce mai mari, care cresc cu o zecime (adică un micron).

Lungimea mai mică de 10 microni pe care vrem s-o precizăm o luăm cu vîrfurile unui compas. Plimbăm unul din vîrfurile compasului pe latura lungă inferioară a dreptunghiului și vedem care dintre cele 9 linii perpendiculare e mai aproape de punctul la care vîrful celălalt al compasului atinge diagonala. Numărul acestei perpendiculare reprezintă în microni lungimea căutată (fig. 33).

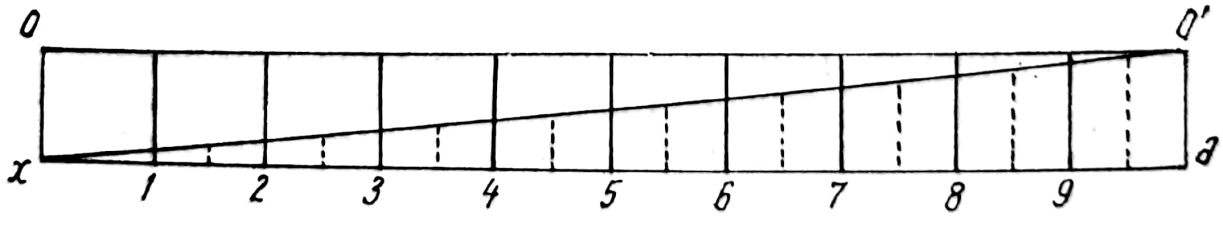



*Fig. 33.* — Scară fracționată (abaca) pentru măsurarea precisă a valorilor dimensionale între 1 și 10 microni (în M. Langeron).

Scanned with OKEN Scanner

# Mersul analizei coproparazitologice

După ce am studiat pe rînd diversele metode utilizabile în analizele coproparazitologice, să încercăm a arunca asupra lor o privire recapitulativă.

1. Nu se va proceda la analiză înainte de a se fi notat aspectul macroscopic al scaunelor în ceea ce privește : a) culoarea, b) consistența ; c) pH-ul.

O atenție deosebită cu ocazia acestui examen macroscopic va fi acordată și prezenței eventuale a unor paraziți pe care bolnavul i-a putut introduce ca atare în masa fecală. Într-adevăr, nu rareori se întîmplă ca bolnavul care elimină oxiuri să culeagă cîteva exemplare ale acestui parazit și să le introducă în recipientul cu materii fecale de analizat. Dacă microscopistul nu dă atenție și elementelor macroscopice, spre surprinderea și indignarea pacientului, el poate totuși nota un rezultat negativ, deoarece în general ouăle oxiurului nu sînt împrăștiate în masa fecală și au putut să lipsească în parcela care a fost examinată. Cavaroc atrage atenția asupra faptului că în materiile fecale lăsate mai multă vreme în contact cu aerul oxiurii se subțiază progresiv și capătă o culoare asemănătoare fondului pe care se găsesc. În consecință ei pot scăpa relativ ușor observației în scaune recoltate mai de mult. Cu atît mai mult trebuie redublată atenția pentru a-i vedea în cazurile în care au fost introduși în mod expres. La fel, unii bolnavi introduc în cutia cu materialul de analizat fără să menționeze faptul — segmente de tenie.

2. Prima probă de analiză microscopică, dacă scaunele sînt proaspete și nefixate, e aceea a examenului microscopic direct cu ser fiziologic, prin care vom putea constata dacă există sau nu protozoare în formă vegetativă și care anume (amibe, *Trichomonas*,



Scanned with OKEN Scanner

*Chilomastix, Balantidium).* În acest examen direct, prin scoborîrea condensatorului, vor apărea cu claritate grație refringenței lor, și chisturile unor protozoare (amibe și flagelate). Chisturile de *Giardia* ne atrag atenția prin forma lor ovalară și uneori prin gruparea lor în mici „insule".

Examenul direct îl începem cu folosirea unui obiectiv mic (3 Reichert) și pentru precizarea elementelor suspecte le vom trece pe rînd la centrul cîmpului și le vom examina cu un obiectiv mai puternic (7 Reichert).

În cursul examenului direct nu trebuie neglijată observarea și notarea existenței a diferite formațiuni neparazitare prezente, care dau informații suplimentare asupra stării digestiei : fibre musculare nedigerate sau digerate numai parțial, grăunțe de amidon, cristale Charcot-Leyden, acizi grași în cristale aciculare, un microbism exagerat. Prin acest supliment de observație nu ieșim din îndatoririle noastre de medici parazitologi ci, dimpotrivă, aducem, pe de o parte documente interesante în ce privește rolul probabil al diferiților paraziți asupra diferitelor stadii ale digestiei, iar pe de alta, dăm putința medicului care va trata afecțiunea parazitară să o facă mai complet, opunîndu-se și la tulburările digestive cauzate de paraziți.

3. Cînd elementele parazitare sînt rare, un ajutor eficace ni-l poate aduce colorarea preparatului direct cu eozină 2% care, colorînd cîmpul și elementele moarte, lasă necolorate elementele vii și le scoate în relief prin contrast cu colorația roșie a cîmpului.

4. Colorația cu lugol — sau încă mai bine cu lugol și thionină ne va fi de folos pentru precizarea structurii unor elemente suspecte. Prin ea apar nucleele chisturilor de protozoare, precum și acea linie diagonală a mănunchiului de flageli din chisturile de *Giardia,* ca și membrana de înveliș a acestor din urmă chisturi.

Dacă în cursul analizei coproparazitologice ne putem dispensa de examenul cu eozină, atunci cînd sîntem foarte aglomerați de numeroase analize, de examenul direct cu ser fiziologic, ca și de examenul cu lugol (cu sau fără thionină) nu ne putem dispensa. Aceste 2 examene sînt obligatorii pentru orice analiză coproparazitologică realizată cu material proaspăt.

5. Dintre metodele de concentrare ar fi de dorit să executăm atît o metodă de flotație, cît și una difazică.

a) Dintre metodele difazice socotim că trebuie aleasă metoda Bailenger, la care faza apoasă are pH-ul 5, iar compoziția ionică a acestei faze, aceto-acetică, se arată foarte favorabilă concentrării de elemente parazitare. Nu găsesc rațiunea pentru care vechea



Scanned with OKEN Scanner

metodă Telemann-Langeron — care este aşa de nocivă prin aciditatea mare a fazei apoase, fără să compenseze această nocivitate printr-o capacitate mai mare de a concentra elementele parazitare — se mai menţine încă în majoritatea laboratoarelor noastre.

b) Dintre metodele de flotaţie, cea mai utilizată în laboratoarele noastre e aceea cu soluţie saturată de clorură de sodiu (metoda Willis-Hung). Avantajul cel mai mare al său rezidă în ieftinătatea sării. Dar dacă există posibilitatea materială, socotim ca mai avantajoasă recurgerea la o metodă care utilizează un lichid mai dens, cum e metoda Kalanterian, care utilizează azotatul de sodiu. Lichidul mai dens dă putinţa de a se ridica la suprafaţă şi ouă mai grele, ca spre exemplu ouăle de ascarizi nefecundate şi chiar ouăle de *Fasciola hepatica.*

În cazurile în care, din cauza aglomerării prea mari a laboratorului, nu se poate executa cîte o metodă din fiecare din cele 2 tipuri (flotaţie şi confruntare difazică), socotim că e de preferat să alegem o metodă de flotaţie de tipul Willis-Hung care este mai uşor de executat şi nu necesită intervenţia centrifugii.

## Răspunsuri necorespunzătoare ale laboratorului.

Sînt cazuri în care, în ciuda prezenţei unor paraziţi în tubul digestiv al unui bolnav, nu se pot găsi ouăle sau chisturile lor în analizele făcute.

1. Aşa, spre exemplu, e cazul unei ascaridioze în care parazitarea e făcută numai de ascarizi masculi.

2. De asemenea, atunci cînd anumiţi paraziţi nu depun în mod obişnuit ouă în tubul digestiv, aşa cum se întîmplă în oxiuriază, al cărei diagnostic îl punem prin metode speciale de căutare a ouălor nu în masa fecală, ci pe pliurile anale sau împrejurul lor *(vide supra).*

3. Tot aşa în cazurile în care viermii au nevoie de o lungă



Scanned with OKEN Scanner

perioadă pentru a ajunge la stadiul de a depune ouă : astfel, spre exemplu, ascarizii nu depun ouă decît la 2 luni şi jumătate după infestare. Ei pot provoca între timp tulburări importante, atît în cursul ciclului perienteric de trecere prin ficat şi plămîni, cît şi mai tîrziu, în stadiul intestinal, pînă cînd în cele 2 luni şi jumătate au ajuns capabili de a depune ouă. La fel este şi cazul fasciolei hepatice, care nu ajunge în stare de a depune ouă decît la cel puţin 3 luni după infestare, în vreme ce între timp, în trecerea prin parenchimul hepatic, poate produce tulburări clinice foarte importante (prima fază a fasciolozei hepatice). Includem în această categorie şi cazul cestodelor mari, ca botriocefalul, care după eliminarea unei porţiuni lungi a strobilei terminale are nevoie de o perioadă de timp pentru ca această strobilă să se refacă pînă la inelele în care să se găsească ouă mature, pe care să înceapă din nou să le elimine sau ca teniile mari, care nu vor reîncepe a elimina noi segmente decît după 2—3 luni (în raport cu lungimea fragmentului eliminat).

4. În cazuri în care unii paraziţi ca de exemplu *Toxocara canis*, pătrunşi în tubul digestiv sub formă de ouă, nu-şi pot realiza complet ciclul perienteric şi rămîn ca larve rătăcitoare în viscere, provocînd afecţiunea denumită *larva migrans* viscerală. Larvele rămîn în „impas parazitar“ (după expresia lui Hervé Harant), nu ajung la maturitate şi parazitul nu va produce, în consecinţă ouă. Prezenţa lui trebuie diagnosticată pe alte căi (hematologice şi imunologice).

5. În cursul perioadelor negative de eliminare a chisturilor la anumite protozoare — cum este *Giardia* — (au fost cazuri în care am fost nevoiţi să repetăm de 10 ori o analiză coprologică, în zile deosebite, la bolnavi suspectaţi de giardioză, pentru a găsi rare chisturi, abia la cea de a 10-a analiză. Un mare ajutor ne dă în asemenea cazuri tubajul duodenal, care poate evidenţia formele vegetative ale *Giardiei.*

6. Scaunele păstrate cu prea mult timp înainte de analiză vor fi putut prezenta forme vegetative ale unor protozoare care nu posedă formă chistică şi care au murit între timp, cum este *Trichomonas intestinalis* sau *Dientamoeba fragilis.* Primele nu se elimină decît cu scaunele diareice — deci nu avem şansa să le găsim decît în atari scaune. *Dientamoeba fragilis* în condiţii neprielnice moare, se vacuolizează şi nu o mai putem recunoaşte.

7. Uneori paraziţii intestinali sînt deosebit de rari în tubul digestiv. Aşa, spre exemplu, e cazul strongiloidozei după unele tratamente. Ho Thi Sang, Brumpt şi Lapierre arată că nu putem considera ca vindecat de strongiloidoză un caz atîta vreme cît per-



Scanned with OKEN Scanner

sistă o eozinofilie foarte ridicată. Repetînd mereu analizele, care apar negative, vom sfîrşi prin a găsi una sau două larve prin metodele adecvate.

8. Puţina abundenţă în care se găsesc uneori în scaune unele protozoare face necesară metoda culturilor pentru a le găsi, adică o îmbogăţire parazitară. Coproculturile pe medii adecvate au ridicat procentul de parazitare cu *Chilomastix mesnili, Embadomonas hominis* şi alte protozoare.

9. Anumite medicamente antiprotozoice sau antihelmintice pot duce la rărirea paraziţilor şi inclusiv a elementelor parazitare susceptibile a fi găsite la examenul coproparazitologic (ouă sau chisturi), sau chiar la împiedicarea apariţiei lor. E ceea ce Junod denumeşte „camuflaj medicamentos". Se ştie că unele medicamente ca cele arsenicale sau ca hexilrezorcina, pot provoca o încetare de pontă la unii helminţi, ceea ce ne obligă a repeta controlul coproparazitologic peste o lună după luarea medicamentului, pentru ca această încetare temporară de pontă să fi fost depăşită şi să ne asigurăm că s-a ajuns la vindecare.

10. Lipsa de atenţie suficientă din partea observatorului. După cum am spus mai sus, examinarea se începe cu obiective slabe, la care elementele parazitare pot apărea aşa de mici încît să scape observaţiei unui cercetător neatent. Uneori ouăle de *Opistorchis felineus* şi mai frecvent încă oochisturile de *Izospora belli* pot fi trecute cu vederea la un examen rapid.

În toate aceste cazuri, cu excepţia celor de la nr. 10, laboratorul nu poate fi învinuit de rezultatele necorespunzătoare pe care le dă, dar care nu ţin de modul de efectuare a analizei, ci de condiţii independente de el.

Cît despre lipsa de atenţie de la punctul 10, ea este adesea generată de aglomerarea cu prea multe analize şi de oboseala firească a ochilor pe care o aduce această aglomerare, cu toate că, vorba lui Creangă : „mai multă băgare de seamă nu strică".

Să privim acum şi cealaltă faţă a problemei : laboratorul dă rezultate exacte -- dar ele se pot raporta la elemente parazitare care nu aparţin bolnavului respectiv, ci sînt numai „în trecere" prin tubul său digestiv. Cel mai adesea acest fapt se întîmplă în cazul ouălor de *Dicrocelium dendriticum* la indivizi care au consumat recent ficat parazitat, de miel sau de vacă. La fel se pot întîlni ouă de trecere de acantocefali sau gongiloneme la indivizi care au consumat măruntaie de porc. Paraziţii de mai sus, în cazuri foarte rare, pot parazita şi la om. Este deci de datoria medicului



Scanned with OKEN Scanner

care interpretează analiza să aprofundeze problema, pentru a stabili dacă e vorba de un parazitism real sau de o trecere întîmplătoare a acelor elemente parazitare prin tubul digestiv, fără nici o semnificaţie patologică. În general, problema se rezolvă repetînd analiza în condiţii de alimentaţie controlată — supunînd, spre exemplu în prealabil, bolnavul 3 zile la un regim lactat.

Tot ca ouă de trecere, care nu rareori apar în analize, citǎm ouăle de *Heterodera radicicola*, nematod pe unele vegetale. Există în istoricul parazitologiei un caz de eroare, care a făcut pe vremea lui multă vîlvă, cînd un fruntaş al acestei ştiinţe a considerat drept paraziţi ai omului (şi le-a şi dat nume specifice noi) nişte coccidii de sardele şi scrumbii. Într-unul din cazurile analizate la secţia clinică de parazitologie am întîlnit la analiza coprologică un număr neobişnuit de mare de acarieni, în toate stadiile de dezvoltare. Ei proveneau dintr-un lot de făină din care se prepara pîinea în gospodăria respectivă. Se pot găsi acarieni şi în scaunul persoanelor care au consumat unele marmelade rău preparate şi rău păstrate.

Dar totuşi nu întotdeauna laboratorul e lipsit de vină cînd semnalează paraziţi care nu există la bolnavii în cauză.

În laborator s-a putut utiliza, spre exemplu, pentru diluarea materiilor fecale, o apă în care se puteau găsi flagelate libere, sau sticlăria utilizată la o analiză anterioară nu a fost bine spălată şi au rămas pe ea elemente parazitare de la acea analiză.

De asemenea, unii bolnavi aduc la laborator proba de materii fecale în borcane murdare, în care se pot găsi diverse elemente care se încorporează în materialul de analizat, dar nu aparţin probei respective. Pentru a evita astfel de deficienţe se va cere bolnavilor să aducă materialul în flacoane foarte curate şi bine uscate, iar laboratorului, cum e de la sine înţeles, să acorde toată atenţia produselor cu care lucrează.

Un ultim paragraf la acest capitol, înainte de redactarea buletinului, priveşte competenţa şi experienţa cercetătorului. Multe elemente care pot fi întîlnite în analize pot preta la confuzie cu elemente parazitare. Ele pot pune în dubiu pe unii observatori. În acest caz e preferabil să nu se pronunţe asupra lor pozitiv sau negativ, în sensul unor elemente parazitare, decît după reîntîlnirea aceloraşi elemente în situaţii sau în poziţii care să lămurească mai bine de ce fel de element este vorba, iar dacă dubiul persistă să se repete noi examene realizate în alte condiţii alimentare, care ne vor putea ajuta la lămurirea problemei.

Scanned with OKEN Scanner

# Redactarea buletinului de analiză

Buletinul trebuie să fie cît mai complet, pentru a putea fi cît mai util. El va trebui să cuprindă, pe lîngă numele bolnavului şi al medicului care a cerut analiza, date asupra caracterelor macroscopice şi microscopice ale materiilor fecale şi care trebuie să se adauge datelor parazitologice propriu-zise.

Trebuie notate : culoarea, consistenţa, pH-ul, prezenţa de alimente insuficient digerate (fibre musculare, amidon), de sînge, de mucus sau glere, prezenţa de acizi graşi, de floră iodofilă, raritatea sau abundenţa bacteriaceelor, prezenţa de leucocite, de cristale Charcot-Leyden, de celule de descuamaţii intestinale.

Toate datele de mai sus, privind situaţia tubului digestiv, sînt utile medicului pentru luarea de măsuri imediate, ca de pildă : administrarea de enzime pentru supleerea celor care lipsesc etc. Dar ele sînt utile şi parazitologiei clinice pentru că se adaugă drept documente noi la studiul patogeniei paraziţilor intestinali. Pe baza lor vom înţelege mai bine acţiunea nefastă a unuia sau altuia din aceşti paraziţi.

În ceea ce priveşte elementele parazitare, acestea se vor nota pe rînd, dacă sînt prezente : protozoarele (chisturi sau forme vegetative) şi viermii (ouă sau larve). De asemenea, artropodarii (larve de muscide, acarieni etc.), chiar dacă sîntem convinşi că nu reprezintă paraziţi ai bolnavului în cauză, ci sînt simple elemente de trecere.

Abundenţa tuturor acestor elemente parazitare sau neparazitare va fi notată cu plusuri — între 1 plus şi 4 plusuri.

Buletinul va trebui să menţioneze şi faptul că nu se referă în nici un fel la oxiuriază, care, cum am văzut, se depistează de obicei prin metode speciale.

În cazul în care laboratorul are vreun dubiu asupra unora din elementele găsite, va nota pe buletin că doreşte repetarea analizei cu un nou material fecal.



Scanned with OKEN Scanner

Dăm mai jos un model de buletin.

*Buletin de analiză*

Data . . . . . .

Examen coproparazitologic al bolnavului . . . . . .
Cerut de . . . . . .
I. *Examen macroscopic*
Culoare . . . . . .
Consistență . . . . . .
pH . . . . . .
Paraziți vizibil macroscopic . . . . . .
Alte date . . . . . .
II. *Examen microscopic*
a) Elemente parazitare
Protozoare { chisturi . . . . . forme vegetative . . . . . .
Helminți { ouă . . . . . larve . . . . . .
Artropode . . . . . .
Fungi . . . . . .
b) Elemente în raport cu starea funcțională a tubului digestiv
Hematii . . . . . .Cristale Charcot-Leyden . . .
Mucus . . . . . .Acizi grași . . . . . .
Fibre musculare nedigerate . . . . . .
Celule de descuamare intestinală . . . . . .
Bacteriacee . . . . . .
Grăunțe de amidon nedigerate. Alte elemente . . . . . .

Elementele prevăzute se vor nota cu unul sau mai multe plusuri, în raport cu abundența lor.

Prezentul buletin nu se referă la oxiuriază, a cărei diagnosticare cere metode speciale.

Medic de laborator,

# Dezinfecția sticlăriei

Mulți autori, între care citățm pe Ho Thi Sang și pe Y. Golvan, recomandă apa de Javel diluată 1/3 pentru curățirea sticlăriei utilizate și neutralizarea elementelor parazitare. Acest lichid este totuși insuficient pentru neutralizarea unor ouă de helminți și chiar Ho Thi Sang arată că ouăle de tenie pot rămîne nealterate



Scanned with OKEN Scanner

în apa de Javel mai multe zile.

Noi utilizăm amestecul sulfocromic pe care-l preparăm astfel :

— se dizolvă în 450 ml apă distilată, 50 g bicromat de potasiu ;

— se adaugă în soluţia de mai sus — lent şi turnînd acidul în soluţia apoasă — 500 ml acid sulfuric tehnic concentrat.

Hans Engelbrecht şi colab. (1965) dau următoarea formulă de preparare : acid sulfuric tehnic concentrat se agită cu o baghetă de sticlă, în timp ce se adaugă treptat bicromat de potasiu, pînă ce soluţia e saturată şi bicromatul adăugat nu se mai dizolvă.

Personal nu am utilizat acest mod de preparare.

Amestecul rămîne foarte activ, atîta vreme cît îşi păstrează culoarea brun-închisă. Trecerea culorii spre verde-închis arată slăbirea activităţii.

Sticlăria se ţine în această soluţie 1—3 zile, apoi se spală la curent de apă. Se trece după aceasta în apă în care s-au pus cîteva picături de amoniac, pentru a se îndepărta orice rest de acid, după care se trece din nou într-un curent de apă (Engelbrecht şi colab.).

# Descrierea elementelor parazitare susceptibile a fi găsite la analiză

## Protozoare parazite

### Clasa Rizopodelor

Dintre Rizopode se pot găsi reprezentanţi ai familiei *Amoebidae*, aparţinînd următoarelor genuri :

*Entamoeba*
*Endolimax*
*Pseudolimax*
*Dientamoeba*



Scanned with OKEN Scanner

Genul *Entamoeba* este reprezentat de următoarele specii : *E. coli, E. histolytica, E. dispar, E. hartmanni* şi *E. polecki.*

**Entamoeba coli.** Trăieşte în intestinul gros. În scaunele diareice, ca şi în cele mulate, dar foarte moi, poate fi întîlnită în forma vegetativă. Măsoară între 20 şi 30 de microni. E foarte refringentă şi se observă uşor atunci cînd întunecăm cîmpul microscopic prin scoborîrea condensatorului. Privită la examenul direct în ser fiziologic, şi chiar în ser fiziologic cu eozină, se poate urmări felul său de mişcare care este în general lent la temperatura laboratorului. Totuşi în scaunele diareice mişcările ei pot deveni mai vii şi cu atît mai vii cu cît scaunul e mai lichid şi cu cît temperatura exterioară este mai ridicată, nu însă peste 37°C, pentru că peste această temperatură moare. În scaunele diareice, obţinute după un purgativ salin, mişcările ei sînt deosebit de vioaie, întocmai ca şi acelea ale entamoebei dizenterice. Corpul parazitului e alcătuit din 2 pături : una externă, hialină, ectoplasma, şi una internă, granulară, endoplasma. Pseudopodele sînt alcătuite din ectoplasmă. Ele sînt în general largi şi scurte.

Cele două pături sînt bine diferenţiate între ele, dar nu la fel de bine diferenţiate ca la *E. histolytica,* la care ectoplasma e mult mai refringentă. Atunci cînd amoeba se mişcă lent forma sa este în general circulară, iar nucleul central. Dar poziţia centrală a nucleului, după cum cu drept cuvînt observă Ho Thi Sang, nu e o regulă absolută pentru această specie. Nucleul măsoară 5—6 microni în diametru. E ca o veziculă înconjurată de o membrană nucleară relativ groasă şi bine vizibilă, tapisată pe faţa sa internă cu grăunţe grosolane de cromatină. În interiorul nucleului se găseşte un corpuscul caracteristic, cariosomul, care la *E. coli,* spre deosebire de *E. histolytica,* este excentric. Mnemotehnic se poate reţine : nucleul central (prin încetineala mişcărilor sale) şi cariosom excentric. Aceste 2 caractere sînt inverse la *E. histolytica* la care, în general, nucleul e periferic (fiind balotat la periferie prin voiciunea mişcărilor sale), iar cariosomul este central. Dar trebuie făcută, în privinţa poziţiei centrale a nucleului la *E. coli,* rezerva menţionată.

*Entamoeba coli* se hrăneşte cu microorganisme, bacterii sau alte protozoare mai mici *(Trichomonas,* chisturi de *Giardia)* pe care le înglobează prin pseudopode. Acestea învăluiesc prada şi sfîrşesc prin a o introduce în endoplasma amibei. E felul de hrănire care poartă şi numele de „înglobare ameboidală". Nu se hrăneşte cu hematii. Se dezvoltă în general cînd intestinul are o reacţie alcalină sau neutră.



Scanned with OKEN Scanner

Produce chisturi caracteristice care sînt rotunde, posedă o coajă relativ groasă şi 8 nuclee (cînd sînt mature). Excepţional se întîlnesc şi chisturi cu 16 sau chiar 32 de nuclee. Aceştia au aceeaşi structură ca şi aceea a nucleului formei vegetative. În mod obişnuit chisturile sînt acelea care ne atrag atenţia asupra prezenţei *Entamoebei coli.* Ele se pot găsi şi în scaunele diareice — dar mult mai adesea în scaunele mulate şi chiar tari. Măsoară în general 20 de microni în diametru. Mărimea lor nu reprezintă însă un caracter sigur de identificare. Există şi chisturi care nu măsoară decît 15 microni, la fel cu acelea de *Entamoeba histolytica,* precum şi forme vegetative de *E. coli* de talia formei vegetative a formei minuta a *E. histolytica* sau a *E. dispar.* De asemenea, dacă numărul nucleelor chistului e în mod obişnuit de 8, chistul a început prin a trece prin faza în care nu avea decît 2 sau 4 nuclee. De aceea e necesar a examina un număr mai mare de chisturi pentru a ne asigura că e în adevăr vorba de o amibă cu chisturi cu 8 nuclee şi deci că e vorba de *Entamoeba coli.* Pe lîngă nuclee chisturile posedă cîteva baghete siderofile foarte subţiri.

*Cultura,* după cum arată Lamy, reuşeşte uneori cu greutate. După acest autor „simplul fapt că o cultură care a pornit în primul moment bine, dar care chiar de la a 2-a sau a 3-a trecere devine mai puţin abundentă, pentru a dispare în curînd, e caracteristic pentru *E. coli*".

*Rol patogen.* Se consideră în general că *E. coli* e lipsită de rol patogen. De aceea ea nici nu e semnalată în unele buletine de analiză. Socotim că această atitudine nu e justă. Este drept că *E. coli* nu produce ulceraţii intestinale, dar ea poate produce toxine şi e susceptibilă de a produce tulburări alergice prin care se dezlănţuie procese de colită — în special atunci cînd se găseşte în număr mare. De asemenea, poate întreţine şi agrava o colită preexistentă prin alte cauze.

**Entamoeba histolytica.** După cum se ştie, această specie poate îmbrăca 2 forme, cu comportamente foarte deosebite. O formă mai mare, forma „magna" sau „histolytica", hematofagă şi cu tendinţa de a se introduce în ţesuturi, şi o formă mai mică forma „minuta", care se hrăneşte numai cu debriuri şi microorganisme intestinale, dar nu cu sînge. Ambele trăiesc în intestinul gros. Dar forma *histolytica,* pătrunzînd în ţesuturi, poate fi transportată prin vasele sanguine şi în alte organe. Ea produce acolo tulburări grave (abcese în ficat, plămîn sau chiar abcese cerebrale). *Entamoeba histolytica* în stadiul *minuta* măsoară 15 microni pe cînd în stadiul *histolytica* poate ajunge la 30 sau chiar 40 de microni. Nucleul acestei amibe posedă o membrană nucleară mai fină, tapisată pe faţa internă cu granulaţii cromatice mai fine şi mai regulat dis-



Scanned with OKEN Scanner

puse. Cariosomul nucleului este central şi comparativ mai mic decît cariosomul nucleului *E. coli*.

În stadiul *magna*, *Entamoeba histolytica* se mai deosebeşte de *E. coli* prin refringenţa mai mare a ectoplasmei, care face mult mai distinctă deosebirea dintre ectoplasmă şi endoplasmă. De asemenea, prin granulaţiile mai fine ale endoplasmei precum şi prin felul de mişcare „liniară" datorită formării unui pseudopod din ectoplasmă, care o alungeşte într-o anumită direcţie. În pseudopod pătrunde curînd endoplasma şi amiba se deplasează în acea direcţie. Fenomenul se continuă la fel mai departe, ducînd la alunecarea într-o anumită direcţie a amibei, alungită ca o limace, dar o limace deosebit de rapidă. Deplasarea rapidă face ca nucleul să fie balotat spre partea opusă direcţiei de mişcare şi să devină periferic. Cariosomul acestui nucleu e însă de regulă central şi subcentral, caracter — după unii autori — important de deosebire între *E. coli* şi *E. histolytica*.

*Entamoeba histolytica* e şi cu mult mai rezistentă la căldură, faţă de *E. coli*. Ea suportă şi temperaturi care depăşesc 37°C, mergînd pînă la 40°C. Simici a arătat că poate suporta şi frigul pînă la 0°, dacă e ferită de uscăciune — factor pe care *E. coli* nu îl poate suporta.

Dar caracterul cel mai important de deosebire între *E. coli* şi *E. histolytica* e că cea de a doua în stadiu *histolytica* se hrăneşte şi cu hematii, pe care le înglobează cu voracitate. Se pot întîlni unele exemplare care au ingerat pînă la 30 de hematii. Eritrocitele ingerate sînt digerate fără a-şi fi modificat în aparenţă structura

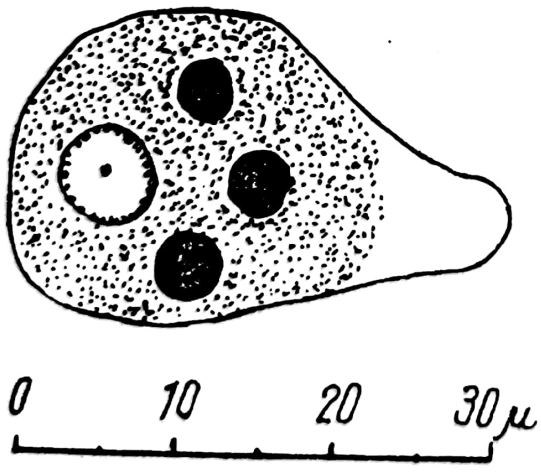



*Fig. 34. — Entamoeba histolytica* (cu 3 hematii ingerate).

omogenă. Ele par că se topesc în endoplasma parazitului. E interesant că în corpul amibei nu se pot pune în evidenţă urme de fier prin reacţii histochimice. Se crede că hemoglobina se separă de eritrocit şi este eliminată în mediul din afară, fără de a se descompune (Pavlovski) (fig. 34).



Scanned with OKEN Scanner

Numai forma *minuta* a *Entamoebei histolytica* poate produce chisturi. Acestea sînt rotunde, măsoară în general 15 microni şi posedă o membrană mai subţire decît chisturile de *E. coli.* Nu au decît 4 nuclee şi cîteva baghete siderofile mai scurte, mai groase şi cu vîrfurile rotunjite (fig. 35). În momentul eliminării lor însă chisturile sînt în stadiu de un singur nucleu şi posedă în plus o

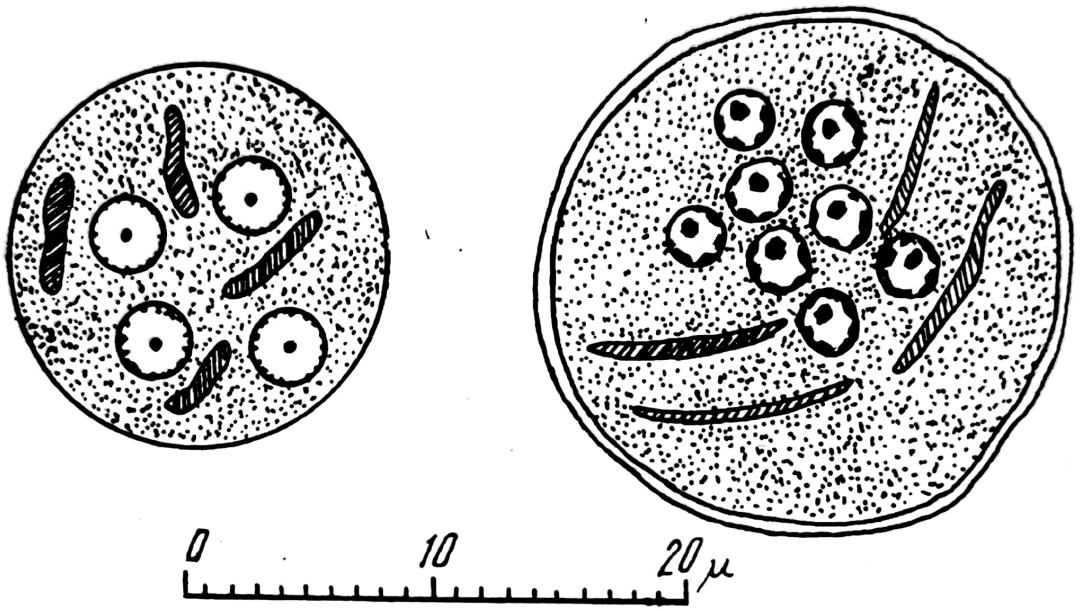



*Fig. 35.* — Chist de ***Entamoeba histolytica*** (în stînga) şi de ***Entamoeba coli*** (în dreapta).

mică vacuolă cu glicogen. Odată cu maturarea chistului în mediul extern, nucleele se multiplică pînă la 4 şi vacuola cu glicogen dispare. Dacă deci pentru găsirea formelor vegetative caracteristice e bine să examinăm materiile fecale cît mai aproape de momentul emisiunii lor, „scaune calde încă", pentru chisturile caracteristice e mai bine a amîna examinarea cu 24 de ore.

Nu se poate preciza cauza care transformă stadiul „minuta" în stadiu „histolytica". Uneori intră în joc factori legaţi de alimentaţie, ca spre exemplu ape magneziene (E. Brumpt), tulburări digestive datorate unor regimuri excesive sau o schimbare bruscă de regim alimentar. Alteori factori de ordin patologic : o „răceală", o stare gripală sau o altă maladie intercurentă.

E deosebit de interesant faptul că transplantată cu o sondă rectală în intestinul pisicii tinere, *Entamoeba histolytica* nu poate îmbrăca decît forma „histolytica", ceea ce arată cum condiţiile particulare prezente în diferite organisme parazitate influenţează forma sub care se poate prezenta această amibă.



Scanned with OKEN Scanner

**Entamoeba dispar.** O problemă care a fost dezbătută viu într-o vreme, primise apoi o soluţionare grăbită şi fusese lăsată în uitare, dar care revine astăzi din nou în discuţie, este aceea a existenţei sau neexistenţei speciei *Entamoeba dispar,* creată de E. Brumpt în 1926. Ea seamănă întrutotul cu *E. histolytica* în stadiul *minuta* şi, ca şi aceasta, produce chisturi cu 4 nuclee. Prin definiţie *Entamoeba dispar* este o amibă genetic nepatogenă, adică o amibă care nu poate îmbrăca niciodată forma *histolytica.* Existenţa ei explică fapte de ordin epidemiologic în aparenţă ciudate, ca spre exemplu frecvenţa deosebit de mare de amibe cu chisturi cvadrinucleate, în regiuni în care cazurile de dizenterie amibiană sînt deosebit de rare. Aşa se întîmplă în Anglia, şi tocmai situaţia epidemiologică a dizenteriei amibiene în această ţară a impresionat pe E. Brumpt atunci cînd a creat noua specie *E. dispar.* Dar situaţii asemănătoare au fost observate şi în alte ţări şi, spre exemplu, Pavlovski o citează la Leningrad : Gnezdilov — citat de Pavlovski — afirmă că „în orice caz, în clima temperată există o mare neconcordanţă între frecvenţa cazurilor purtătoare de chisturi cu 4 nuclee şi dizenteria amibiană care nu se observă decît abia la 3% din numărul purtătorilor de asemenea chisturi".

S-a zis că este vorba de condiţii de viaţă deosebite care nu solicită transformarea formei „minuta" în forma „histolytica". Este posibil. Dar nu e mai puţin adevărat că un pacient care a căpătat dizenteria amibiană într-o regiune tropicală şi care continuă apoi să trăiască în metropolă poate face, din cînd în cînd, accese amibiene tipice (şi abcese de ficat supraadăugate), pe cînd cineva care a căpătat amibiază cu *E. dispar,* indiferent de ce fel de viaţă ar duce, de modificări bruşte de regim, consum de ape magneziene etc., nu este susceptibil să facă tulburările clinice ale dizenteriei amibiene. În Anglia, ca şi în regiunea Leningradului şi în multe alte regiuni în care există *E. dispar,* fără îndoială că au existat şi mulţi indivizi care au făcut excese digestive de tot felul, dar care nu s-au repercutat în sensul unei transformări a amibelor pe care acei indivizi continuau să le găzduiască.

S-a argumentat de unii autori că o amibă de tipul „dispar" izolată de la un individ dintr-o regiune continentală, dacă e trecută experimental prin ficatul unui hamster devine patogenă şi dă abces de ficat la hamster, întocmai ca şi *E. histolytica* în stadiul său histolitic. Dar nici acest argument nu este îndeajuns de valabil. Nu se pune în discuţie valoarea patogenă a unei amibe pentru hamster, ci pentru om. Faptul de a deveni patogenă pentru hamster, întocmai ca şi tipul histolitic al *E. histolytica,* nu implică iden-



Scanned with OKEN Scanner

titatea cu această amibă în ceea ce privește patogenitatea pentru om.

Trecerile experimentale din ultimii ani au fost, credem noi, greșit îndrumate chiar și atunci cînd în loc să se recurgă la pisică drept animal reactiv de experiență s-a recurs la un alt animal, ca hamsterul sau ca guzganul. Pisica reacționează net deosebit față de cele 2 tipuri de amibe în discuție. Cele 2 animale utilizate azi pot avea o valoare experimentală cu totul deosebită în aceeași problemă.

Să revenim deci la experiențele care au stat la baza creării speciei *E. dispar*. Ele s-au referit la pisică și nu la guzgan. Pentru pisică rezultatele care se obțin sînt perfect caracteristice. Acest animal inoculat intrarectal cu *E. histolytica* face leziuni ulcerative tipice și moare de amibiază. La el parazitul nici nu poate îmbrăca altă formă decît aceea mare, histolitică. Dacă însă e inoculat cu *E. dispar*, nu face niciodată leziuni ulcerative. Dacă, așadar, continuăm să ne menținem la aceste experiențe, nu se poate să nu sfîrșim prin a recunoaște că e vorba de două specii biologice deosebite care, față de *aceeași* gazdă, reacționează totdeauna deosebit, și să nu acordăm *Entamoebei dispar* dreptul de a fi considerată ca o specie biologică deosebită, care merită a fi denumită cu un nume propriu și a cărei prezență în organismul uman e departe de a ne îngrijora mai mult decît ne îngrijorează *E. coli*, întrucît ea nu are nici tendința, nici putința în condițiile vieții de toate zilele (nu în condiții artificiale experimentale) să se transforme într-o formă patogenă pentru om.

Vechea concepție a profesorului E. Brumpt, de existență a unei forme biologice de *Entamoeba* asemănătoare morfologic cu *E. histolytica*, dar biologic-genetic deosebită, începe de altfel să capete azi contururi noi, prin noile cercetări realizate în cea mai mare parte de autori americani, care denumesc azi asemenea tulpini cu numele de „histolytica-like“ sau de „tipul Laredo“, nume noi, dar care în esență, nu reprezintă decît același lucru, și anume că există amibe cu chisturi cvadrinucleate morfologic asemănătoare cu *E. histolytica*, dar biologic deosebite.

**Entamoeba hartmanni.** Și pentru această amibă s-a pus și se pune încă problema dacă poate fi considerată ca o specie deosebită, independentă, sau ca o varietate pitică de *E. histolytica*. Cei mai mulți autori înclină către prima părere, cu atît mai mult cu cît structural și biologic e mai aproape de *E. coli* decît de *E. histolytica*, și am fi înclinați s-o considerăm mai degrabă ca o formă



Scanned with OKEN Scanner

pitică a acesteia, dacă chisturile sale nu ar avea 4 nuclee în loc de 8 (fig. 36).

În stare vegetativă măsoară pînă la 10 microni, iar în stare chistică, 6—7 microni. Se mişcă lent, cu pseudopode scurte. Ectoplasma e foarte puţin diferenţiată de endoplasmă. Nucleul prezintă o cromatină periferică alcătuită din grupuri grosolane şi un cario-

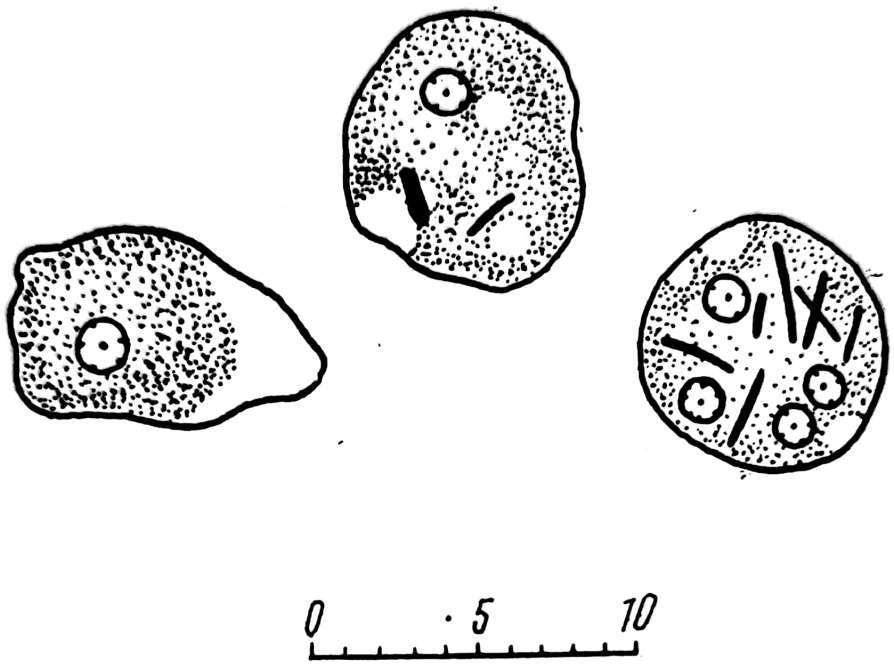



*Fig. 36. — Entamoebà hartmanni.* La mijloc, formă prechistică. În dreapta, chistul.

som relativ mare şi, de cele mai multe ori, excentric. Cultivă mai puţin bine pe mediile difazice, pe care *E. histolytica* se dezvoltă foarte bine. E relativ puţin patogenă pentru pisică, la care inocularea intrarectală reuşeşte greu, iar leziunile pe care le provoacă sînt superficiale. Se hrăneşte cu bacterii. Nu se cunoaşte rolul său patogen.

**Entamoeba polecki.** Este o amibă parazită la porc. Prezenţa ei la om a fost semnalată numai în cîteva cazuri. În ciuda rarităţii cazurilor umane, o vom menţiona totuşi pentru a pune în măsură pe medicii noştri să o regăsească în eventuale noi cazuri. În formă vegetativă seamănă mai mult cu *Entamoeba coli*, dar e mai mică. Endoplasma sa conţine numeroase bacterii şi nu conţine hematii. Nucleul său însă seamănă mai mult cu acela de *E. histolytica* ; are în general un cariosom central şi foarte mic. Cromatina periferică e foarte fină şi distribuită uniform — deşi se găsesc şi cazuri de concentrare a acestei cromatine în unele blocuri mai mari.



Scanned with OKEN Scanner

Ceea ce este însă caracteristic acestei amibe este chistul. De o mărime în general mai aproape de aceea a chisturilor de *E. histolytica*, prezintă un singur nucleu. Are baghete siderofile numeroase, scurte şi grosolane, posedînd de cele mai multe ori vîrfuri ascuţite. Posedă în plus, faţă de chisturile de *E. histolytica* şi *E. coli*, o masă de incluzie relativ mare, de formă rotundă sau ovoidală, de natură necunoscută — care se colorează palid cu hematoxilina ferică în contrast cu baghetele siderofile (fig. 37).

10μ

*Fig. 37.* — Chist de *Entamoeba polecki* (după Markell şi Voge).

*E. polecki* nu pare a avea rol patogen la om.

### Genul Endolimax

Este reprezentat la om numai prin specia *E. nana*. Şi această amibă e mică. Ca formă vegetativă nu depăşeşte 15 microni. La temperatura camerei emite de jur împrejur numeroase pseudopode mici şi foarte refringente, care-i dau o înfăţişare particulară, comparată de Ho Thi Sang cu o grapă de vezicule transparente. La 37°C se alungeşte ca o limace (de aci îi vine numele de *Endolimax*) şi se tîrăşte încet. Nucleul are o structură caracteristică. Nu posedă cromatină periferică. În schimb cariosomul e foarte voluminos, uneori angular, uneori apare în preparaţiile microscopice ca o semilună. Este de cele mai multe ori central. Rareori excentric şi atunci e legat de peretele opus al membranei nucleare printr-un filament cromatic terminat printr-un granul. Chisturile pot ajunge la 10—14 microni — deci foarte aproape de mărimea formei vegetative. Au 4 nuclee cu aceeaşi structură arătată mai sus. Nucleele pot să fie îngrămădite la un loc, sau dispersate.

*Endolimax nana* se hrăneşte activ cu microorganisme. Nu i se atribuie nici un rol patogen. Pentru a se dezvolta în culturi pe medii difazice are nevoie de adaosul de amidon. Totuşi aceste



Scanned with OKEN Scanner

grăunţe nu au fost văzute înglobate în citoplasma ei. Se pare deci că foloseşte amidonul sub o formă solubilă sau în particule extrem de fine, pe care nu le putem observa (Lamy).

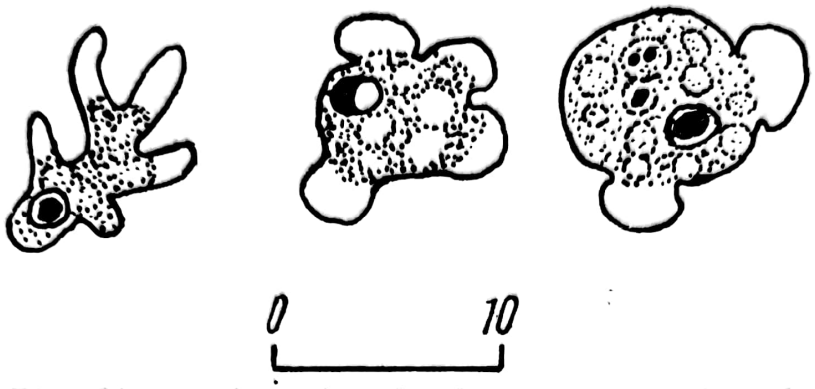



*Fig. 38.* — Aspecte ale formei vegetative de *Endolimax nana* (după Ho Thi Sang).

### Genul Pseudolimax (Iodamoeba)

E al treilea gen din familia amoebide, susceptibil a fi întîlnit în intestinul uman. Specia cea mai cunoscută e *Pseudolimax bütschli.* Ca şi celelalte amoebide şi această specie trăieşte în intestinul gros. În formă vegetativă măsoară între 15 şi 20 de mi-

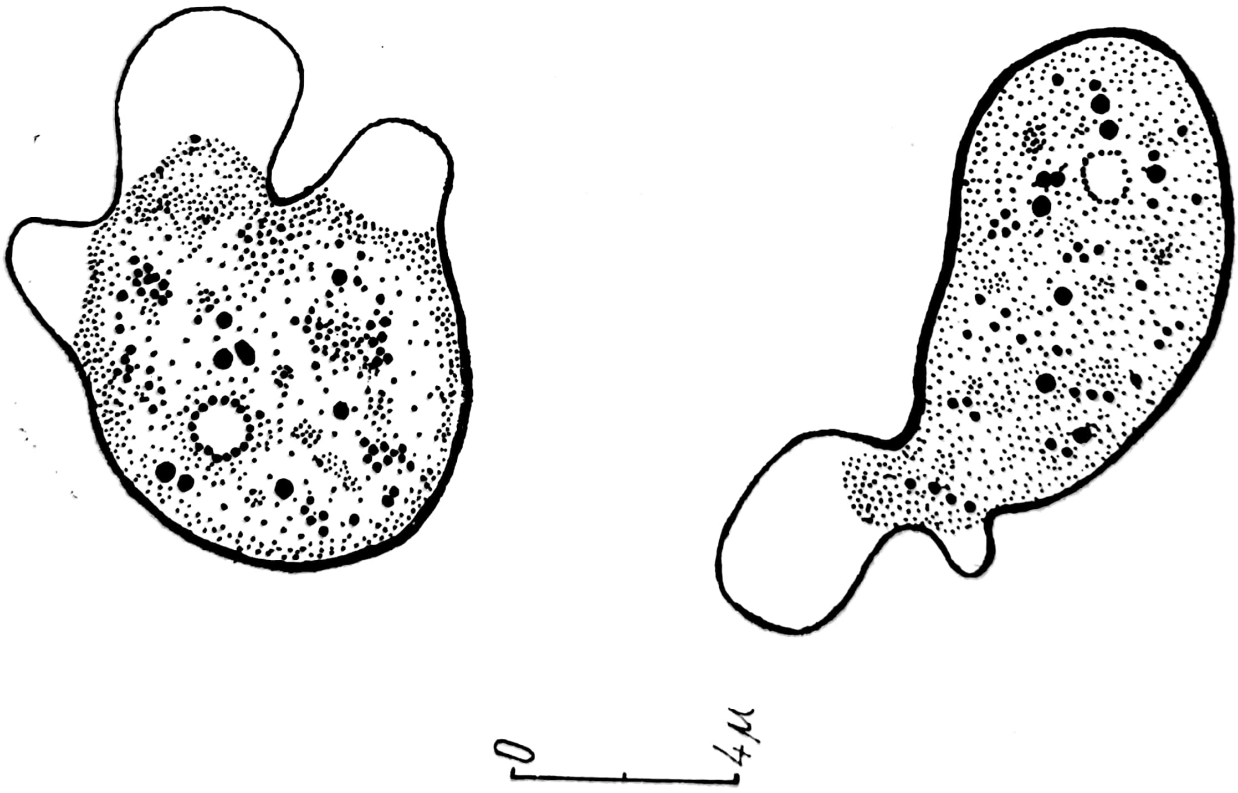



*Fig. 39.* — Aspecte ale formei vegetative de *Endolimax nana* (după L. Lamy).



Scanned with OKEN Scanner

croni. Se mişcă încet. Poate, ca şi specia precedentă, emite la temperatura camerei pseudopode scurte (ca vezicule transparente), pe care le retrage fără a le fi folosit la deplasare. În repaus ectoplasmul e slab diferenţiat de endoplasm. Posedă un nucleu caracteristic. Nu are cromatină periferică. Cariosomul, relativ mare (dar mai mic decît în *genul Endolimax*), este rotund şi înconjurat de granule acromatice, al căror contur alcătuieşte un fel de dantelă fină în jurul lui. E foarte puţin rezistentă şi se găsesc în fecale un număr relativ mare de forme lizate, la care nucleul devine foarte vizibil. Ho Thi Sang consideră că amestecul de forme vii

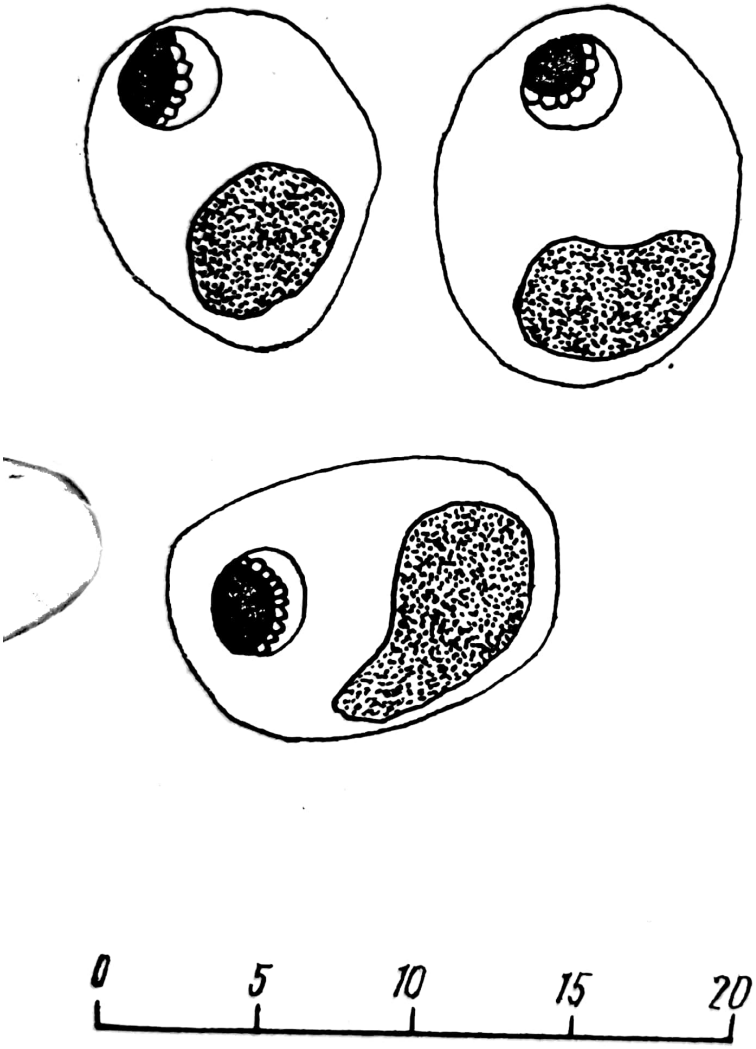



*Fig. 40.* — Chisturi de *Iodamoeba bütschlii.*

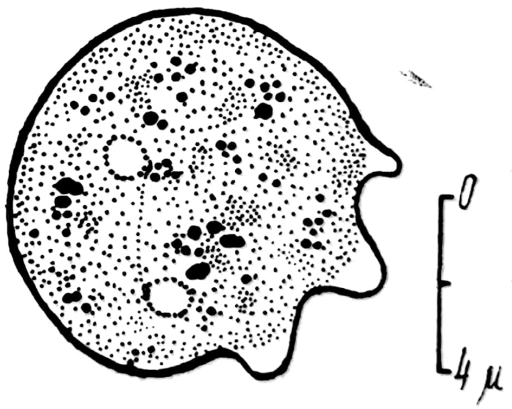



*Fig. 41.* — *Dientamoeba fragilis*, forma vegetativă (după L. Lamy).

şi forme lizate este caracteristic pentru această specie. Se hrăneşte cu microorganisme. Chisturile sale, care se întîlnesc mult mai frecvent decît formele vegetative, măsoară 10—16 microni, au o

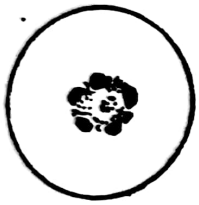


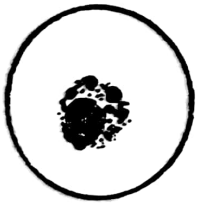
Scanned with OKEN Scanner

formă neregulată : rotundă, alungită sau triunghiulară. Posedă un singur nucleu în care, de cele mai multe ori, cariosomul este excentric, ceea ce face ca granulele acromatice să constituie ca o semilună şi nu ca un cerc în jurul lui. Dar ceea ce este cu totul caracteristic pentru aceste chisturi este existenţa unei vacuole mari cu glicogen. Ea poate ocupa pînă la 1/3 din volumul chistului. Se colorează intens cu iod şi are un contur net, spre deosebire de conturul „flou" al vacuolei cu glicogen din chisturile mature de *E. histolytica* sau *E. coli*. De aci şi numele de chisturi iodofile şi numele de *Iodamoeba*, dat încă genului. Cultivă în general greu şi cultura nu poate ajunge la un număr mare de treceri. Nu este patogenă. Omul reprezintă o gazdă accidentală pentru această specie. Gazda ei adevărată este porcul. Se poate găsi şi la maimuţă.

### Genul Dientamoeba

*Genul Dientamoeba* e reprezentat prin specia *D. fragilis*. Această amoebidă poate avea 2 nuclee (de aci numele *Dientamoeba*), dar există şi exemplare cu un singur nucleu. Mărimea sa este foarte variată. Se pot găsi indivizi foarte mici, de abia 3,5 microni, pe lîngă alţii mari, de 12 microni. Formele mici sînt uninucleate şi considerate ca rezultate din diviziunea unei forme mai mari binucleate.





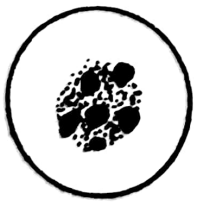


*Fig. 42. — Dientamoeba fragilis.* Variaţii în structura nucleului (după Markell şi Voge).

Nucleele au o membrană subţire, care se colorează greu. În mijloc prezintă 5—6 granule de cromatină, alcătuind împreună un cariosom central. Unii autori socotesc că între aceste granule ar exista una care reprezintă cariosomul din nucleele celorlalte genuri de amoebide, iar restul ar reprezenta grunjii de cromatină care, în loc de a fi dispuşi periferic, s-au alăturat unul de altul central. De multe ori între cele 2 nuclee se observă un filament de cromatină care le uneşte.

Un caracter biologic important al speciei *D. fragilis* este tendinţa de a se menţine perfect nemişcată, în scaunele examinate la temperatura camerei. Sub această înfăţişare poate fi confundată cu nişte chisturi aparţinînd altor specii de amoebide şi tocmai pentru aceasta e considerată ca foarte rar întîlnită. În condiţii prielnice de temperatură, la 37°C, se poate însă deplasa viguros. Numele de *fragilis* vrea să spună că e o amibă foarte puţin



Scanned with OKEN Scanner

rezistentă. În realitate e mult mai puţin fragilă decît s-a crezut odată, dacă însă este ţinută în condiţii bune şi mai ales dacă e ferită de desicare. Totuşi, spre deosebire de alte amibe, moare în contact cu apa de robinet (deci în scaune diluate cu apă în loc de a fi fost diluate cu ser fiziologic). Ea formează atunci o vacuolă centrală mare, iar nucleele se dispun la periferie în poziţie diametral opusă, apropiind înfăţişarea parazitului de aceea a lui *Blastocystis hominis*.

Nu are chisturi sau ele nu sînt încă bine cunoscute. Epstein pare a fi singurul autor care a descris la *D. fragilis* existenţa unui chist de formă eliptică, cu 4 nuclee situate în linie. Alţi autori nu au confirmat această descoperire. Se cultivă cu uşurinţă pe medii difazice. Noi am cultivat-o într-un caz pe mediul Löffler acoperit cu lichid Locke. Kean şi Malloch arată că poate apărea după o zi sau două în culturi făcute din scaune, care la examenul direct apăruseră ca negative.

Se hrăneşte cu microorganisme ; în unele cazuri poate ingera şi hematii, cum a arătat Burrows în 1954, dar nu pătrunde în ţesuturi. Rolul ei patogen nu e bine lămurit. Tot mai mult apar în literatura medicală semnalări de cazuri de tulburări gastrointestinale, care par a fi fost provocate de prezenţa acestei specii. Se pare că e capabilă să elibereze o toxină producătoare de fibroză a ţesuturilor din preajma ei (Burrows şi colab.).

### Paraziţii amoebidelor (hiperparaziţi)

Fac parte din genurile de paraziţi vegetali, aparţinînd ordinului *Kitridineae*. Se prezintă ca mase sferice alcătuite din numeroase granule mici. Se pot întîlni fie în citoplasma amibei, şi atunci aparţin genului *Sferita*, fie în interiorul nucleului, şi aparţin ge-

*Fig. 43.* — Sferita, parazitînd citoplasma unei *Endolimax nana* (după C. M. Wenyon).

nului *Nucleofaga*. E vorba de hiperparaziţi. Ei pot duce, în cele mai multe cazuri la moartea amibei atacate. Există însă şi cazuri în care amibele reuşesc a se debarasa spontan de hiperparaziţii lor. E. Brumpt citează un asemenea caz. O pisică fusese inoculată intrarectal cu *E. dispar* parazitată cu *Sferita*. În cursul infestării rezultate, amibele s-au debarasat spontan de paraziţii criptogamici.



Scanned with OKEN Scanner

Din această clasă vom menţiona, ca paraziţi intestinali susceptibili a fi întîlniţi în analizele coproparazitologice, următorii : *Embadomonas intestinalis, Enteromonas hominis, Trichomonas intestinalis, Chilomastix mesnili* şi *Giardia intestinalis.*

**Embadomonas intestinalis** (sin. : *Waskia intestinalis, Retortamonas intestinalis*). Îl putem întîlni, atît în forma vegetativă, cît şi în aceea de chist, în scaunele diareice şi chiar în scaunele păstoase moi. Parazitul trăieşte în colon şi poate chiar în porţiunea terminală a ileonului.

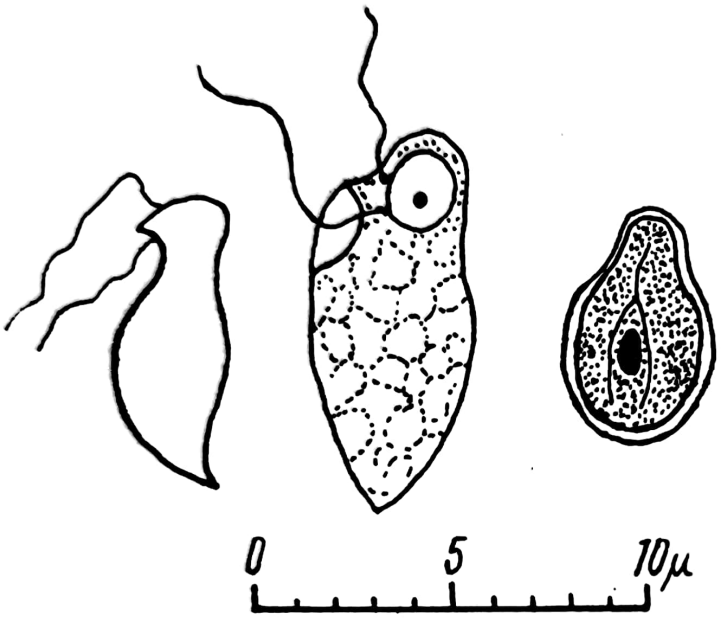



*Fig. 44. — Embadomonas intestinalis.* În stînga se vede profilul caracteristic de pasăre. La mijloc, detalii de structură. În dreapta, chistul (după C. M. Wenyon).

Forma vegetativă e în general alungită, fiind aproape de 3 ori mai lungă decît lată. Se poate găsi însă şi contractat în formă globuloasă, ceea ce se realizează atunci cînd se divide sau cînd se închistează. În forma alungită are o lungime variabilă ; există exemplare mici, de 5 microni, şi altele cu mult mai mari, care pot ajunge, după E. Brumpt şi după Ho Thi Sang, la 17 microni. Wenyon îi dă dimensiunile de 4—9 microni pe 3—4 microni. Posedă un citostom mare, care alcătuieşte ca un fel de ştirbitură în regiunea anterioară a corpului. Porţiunea terminală a parazitului este ascuţită. Aceste 2 caractere sînt de natură a da flagelatului, privit din profil, o înfăţişare particulară, comparată de Wenyon şi de alţi autori cu un profil de pasăre. Nucleul se găseşte în partea anterioară. Vezicula nucleară mare e centrată de un cariosom rotund şi compact, foarte voluminos.

Se deplasează cu vioiciune în cîmpul microscopic prin mişcări smucite, cu ajutorul a 2 flageli, dintre care unul mai lung şi mai subţire e îndreptat anterior, iar celălalt, mai scurt şi mai gros, e recurent şi trece prin mijlocul citostomului (Wenyon, Faust). Flagelii pornesc din cîte un corpuscul cromatic (blefaroplast) situat pe



Scanned with OKEN Scanner

membrana nucleară sau foarte aproape de ea. Se hrăneşte cu microorganisme pe care le introduce prin citostom.

Chisturile sale sînt piriforme. Regiunea atenuată anterioară se termină retezată drept. Măsoară 6—7 microni, pe 4—5 microni. În chisturile bine colorate se evidenţiază în lung două linii lungi, care delimitează un spaţiu ovalar, în care se găseşte nucleul unic, uneori alungit. Aceste linii ar putea reprezenta marginile citostomului. Ele se unesc în partea anterioară, alcătuind figura literei „u", întoarsă spre extremitatea posterioară, rotunjită a chistului, în timp ce de la punctul lor anterior de unire porneşte înspre extremitatea anterioară o scurtă linie ca un flagel, alcătuind cu cele 2 linii în „u" întors un fel de igrec întors în jos. Această linie anterioară nu e totdeauna pusă în evidenţă, ceea ce poate ţine şi de calitatea coloraţiei. Chistul are o coajă groasă. Protoplasma lui e contractată — aşa că rămîne un spaţiu între parazitul închistat şi coaja chistică, ceea ce îi dă aparenţa de a avea un perete dublu (Faust şi Russel).

Parazitul cultivă cu uşurinţă pe un mediu difazic, cum e acela cu ser coagulat de cal al lui Zobell şi Laidlaw. Cultura nu necesită în mod obligator 35°C. Ea se face şi la 25°C, deci la temperatura camerei — şi la această temperatură mai coborîtă trecerile se pot face la 10—15 zile (Lamy).

Nu i s-a semnalat vreun rol patogen.

**Enteromonas hominis** (sin. : *Tricercomonas hominis).* Este un parazit mic, de formă rotundă, ovalară sau triunghiulară (cu vîrful îndreptat posterior). Măsoară în forma vegetativă 4—8 microni lungime. În regiunea anterioară se găseşte un nucleu mare, cu un cariosom mare, central sau uneori excentric. Alături de peretele veziculei nucleare se găseşte o masă blefaroplastică, în care intră cel puţin 2 blefaroplaşti, din care unul se găseşte la originea a 2 flageli anteriori, iar celălalt, la originea unui flagel recurent, care merge în lungul corpului, fără a determina formarea unei membrane ondulante, şi se continuă ca flagel liber posterior. Din cei 2 flageli anteriori, unul este bifurcat, ceea ce a putut face să se creadă că flagelatul ar poseda 3 şi nu 2 flageli anteriori. Lamy observă că parazitul poate să formeze uneori hernii protoplasmatice în lungul bazei flagelilor, ceea ce le dă aparenţa unor apendice voluminoase, atîrnate de corpul celular.

Parazitul se găseşte în scaunele diareice, atît în forma vegetativă, cît şi în cea de chisturi, iar în scaunele mai consistente, numai sub formă de chisturi. Acestea au forma ovalară şi dimensiunea de 6 pe 3 microni. Conţin 2 sau 4 nuclee, în raport cu vîrsta lor.



Scanned with OKEN Scanner

Cele 4 nuclee sînt dispuse în perechi la extremităţile chistului. Uneori coloraţia cu lugol şi cu MIF pune în evidenţă şi flagelii (Ho Thi Sang) (ca şi în chisturile de *Giardia*). În formă vegetativă pare a fi uneori foarte fragil şi la temperatura camerei, în scaunele de cercetat, se poate imobiliza într-un sfert de oră (Ho Thi Sang).

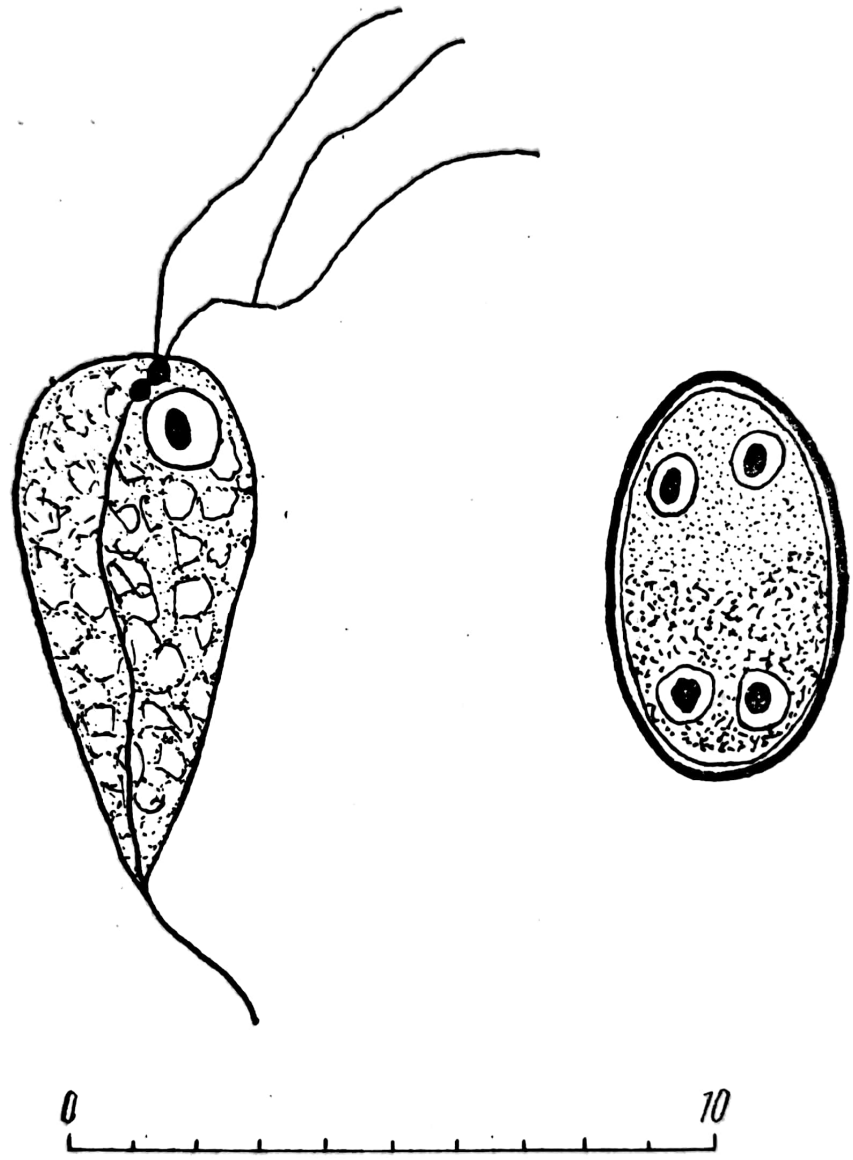



*Fig. 45. — Enteromonas hominis.* În stînga, forma vegetativă. În dreapta, chistul.

Parazitul poate fi cultivat la 37°C, pe medii difazice, cum e mediul L.O.S. al lui Boeck. Lamy arată că se multiplică uşor în culturi cu treceri la 5 zile. Se divide prin sciziparitate longitudinală. Ho Thi Sang e mai rezervată, arătînd că uneori nu se obţine



Scanned with OKEN Scanner

o multiplicare, ca într-o cultură adevărată, ci doar o supraviețuire a formelor vegetative.

Nu se cunoaște nimic despre rolul patogen al acestui parazit.

**Trichomonas intestinalis** (sin. : *Trichomonas hominis*). Măsoară 10—15 microni, pe o lărgime de 7—8 microni.

Are o formă piriformă, cu porțiunea atenuată îndreptată înapoi. Corpul său prezintă însă o mare plasticitate, putîndu-și varia forma cu ușurință în timpul deplasărilor și revenind apoi la forma caracteristică. Astfel, cînd se deplasează activ, fofilîndu-se printre elementele figurate din jurul său, se atenuează și în regiunea anterioară, devenind fuziform cu porțiunea mijlocie îngroșată.

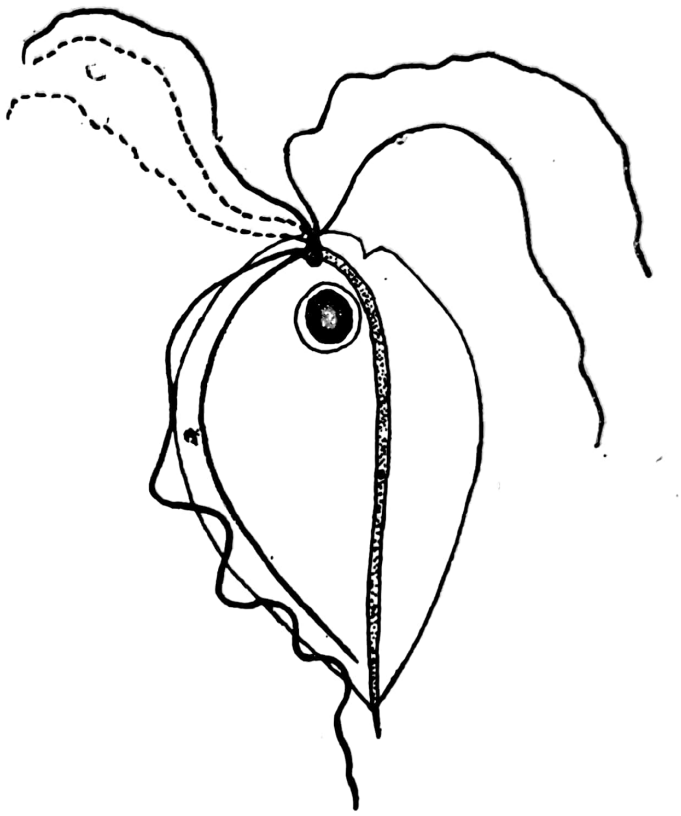


*Fig. 46. — Trichomonas intestinalis.*

Nucleul său are o formă ovoidală. E situat foarte anterior. Deasupra lui se găsește o masă de blefaroplaști, din care pornesc mai multe formațiuni, și anume :

1. 3 pînă la 5 flageli anteriori. Majoritatea formelor intestinale au 4 flageli anteriori.

2. Un flagel recurent, care merge în lungul corpului, determinînd formarea unei membrane ondulante. Aceasta este considerată că ocupă mijlocul fețeI dorsale a corpului. Ajuns la capătul posterior al membranei ondulante flagelul se liberează și se continuă în general ca un scurt flagel posterior liber.

3. O fibră de întărire a bazei membranei ondulante.

4. O formație axială particulară, rigidă, care constituie un schelet axial al parazitului și care iese ca un vîrf ascuțit prin extremitatea posterioară atenuată a flagelatului, purtînd numele de *axostil*.

În regiunea anterioară, ventral, deci opus membranei ondulante, se găsește un mic citostom, ca o crăpătură. Existența acestuia este totuși contestată azi de unii cercetători, care nu au reușit să-l pună în evidență.

Parazitul trăiește în intestinul gros și se hrănește atît prin citostom, cît și mai ales pe cale amoeboidală, prin pseudopode, pe care le poate produce în regiunea posterioară a corpului. De ase-



Scanned with OKEN Scanner

menea, prin pătrunderea directă a substanţelor hrănitoare dizolvate prin peretele corpului, fie că ele erau dinainte dizolvate, fie că dizolvarea lor a fost determinată de parazit prin eliminarea de fermenţi cu rol de digestie externă. Uneori în vacuolele digestive ale flagelatului au fost găsite hematii care s-au putut afla, fie în intestin (datorate unor cauze independente de prezenţa parazitului), fie în mediile de cultură.

Parazitul nu poate fi întîlnit decît în scaunele diareice, ceea ce nu înseamnă că diareea a fost provocată de el, ci numai că el a fost antrenat mecanic de fluxul diareic. Nu are forme de rezistenţă, sau cel puţin nu se cunosc. În schimb forma vegetativă are o mare rezistenţă la condiţiile mediului extern. Cultivă cu uşurinţă pe mediile difazice, atît la 37°C, cît şi la 25°C. Se divide prin diviziune binară longitudinală.

Nu se cunoaşte încă rolul său patogen, dar există părerea că ar putea fi mai patogen decît celelalte flagelate expuse mai sus.

**Chilomastix mesnili.** Este un parazit flagelat, care trăieşte în intestinul gros şi poate şi în partea terminală a intestinului subţire. Are o formă alungită, rotunjit în partea anterioară şi ascuţit în aceea posterioară. Măsoară 15 microni în lungime, pe o lărgime de 5—6 microni. Două elemente morfologice sînt caracteristice acestui parazit :

1. prezenţa unui şanţ de torsiune pe la mijlocul corpului, ca şi cum ar fi apucat cineva extremitatea posterioară a lui şi ar fi răsucit-o ;

2. prezenţa unui citostom mare în partea anterioară a corpului. Este o adîncitură alungită, avînd oarecum forma cifrei 8, adică mai largă în partea ei anterioară şi posterioară, cu o strînsură la mijloc.

Nucleul se găseşte în partea anterioară. E foarte mare. I se descrie un cariosom mic central şi plăci de cromatină periferică, tapisînd faţa internă a membranei nucleare (Faust). Deasupra nucleului se găseşte o masă de blefaroplaşti, din care pornesc :

1. 3 flageli lungi anteriori ;

2. 1 flagel scurt şi ondulat, care se agită necontenit în interiorul citostomului ;

3. două fibrile care înconjură, de o parte şi alta, şanţul citostomal, contribuind la ţinerea acestuia larg deschis.

Parazitul în forma sa vegetativă, în scaunele diareice, e foarte activ, parcurgînd cu repeziciune cîmpul microscopic. Se hrăneşte prin citostom. Se divide prin diviziune binară longitudinală.

În scaunele mulate se găsesc chisturile sale, care sînt deosebit de rezistente la condiţiile variate ale mediului extern. Au mărimea



Scanned with OKEN Scanner

de 7—10 microni, au o formă piriformă, dar partea atenuată este foarte scurtă. Protoplasma este contractată despărţindu-se de coaja groasă a chistului, ceea ce îi dă aparenţa unui dublu contur. Masa protoplasmică contractată nu îmbracă forma piriformă, ci rămîne rotundă, lăsînd neocupată porţiunea atenuată a chistului (Faust). O bună colorație pune în evidenţă în chist nucleul foarte mare şi citostomul cu forma lui în 8 caracteristică, precum şi cele 2 fibrile care îl înconjură. Se văd, de asemenea, rudimente ale flagelilor protozoarului.

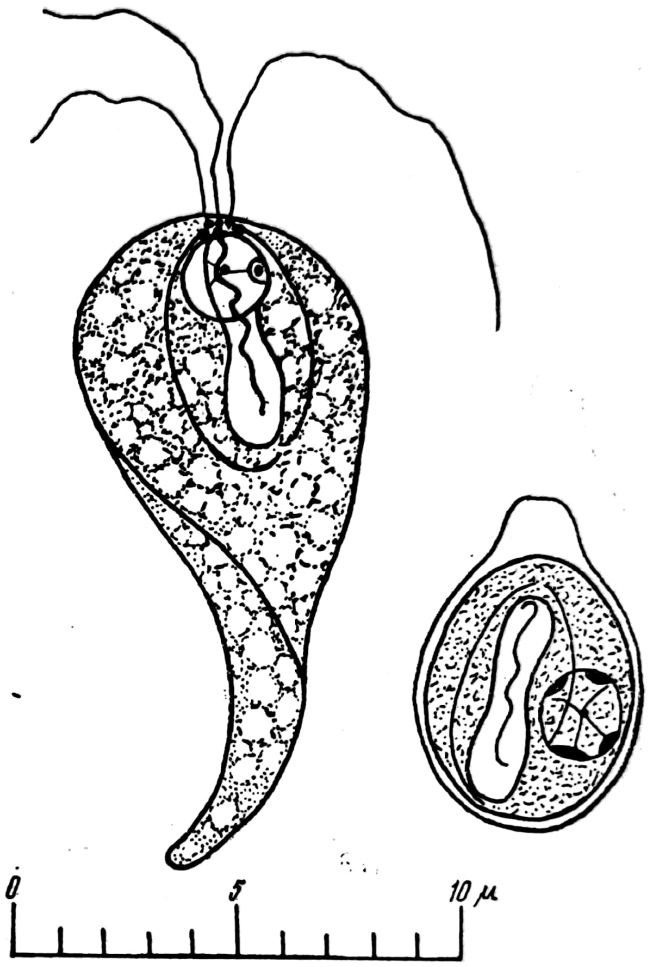



*Fig. 47. — Chilomastix mesnili.* În stînga, forma vegetativă. În dreapta, chistul.

Cultura nu dă totdeauna rezultate satisfăcătoare. În loc de o adevărată multiplicare, ea se poate menţine uneori doar la o supravieţuire a parazitului şi un început de închistare (Ho Thi Sang). Totuşi, în unele cazuri, în materiile fecale negative la examinarea directă nu s-a decelat parazitarea cu *Chilomastix,* decît pe baza culturilor. După Lamy cultura dă rezultate bune la 37°C şi treceri la 5 zile.

**Giardia intestinalis.** E cel mai mare dintre flagelaţii intestinali. În stare vegetativă măsoară 15—20 de microni. Prezintă un corp asemănător cu o pară tăiată în lung, pe din două. Are deci o faţă bombată, care e faţa dorsală, şi una plană, care e faţa ventrală. La rîndul ei aceasta din urmă are o teşitură a întregii suprafeţe rotunjite, care reprezintă partea anterioară. Cu această teşitură parazitul se aplică pe celulele intestinale. De aceea a fost multă vreme socotită ca un citostom. Este, de fapt, numai un fals citostom. Parazitul se hrăneşte prin întreaga suprafaţă a corpului prin care pătrund substanţele alimentare dizolvate în mediul înconjurător.



Scanned with OKEN Scanner

Cea mai mare deosebire între speciile genului *Giardia* şi flagelatele descrise mai sus e că în loc de un singur nucleu, posedă 2 nuclee. Ele sînt foarte mari şi situate în regiunea anterioară, rotunjită, a corpului, mai aproape de faţa ventrală, plată, decît de aceea dorsală, boltită. În lungul porţiunii anterioare, în spaţiul median dintre aceste 2 nuclee, se găsesc înşirate 4 perechi de blefaroplaşti, din care pornesc 8 flageli. Situaţia lor e reprezentată pe fig. 48. Cei 2 flageli care pornesc din perechea cea mai anterioară de blefaroplaşti, după cum se vede pe figură, merg paralel în tot lungul corpului şi ies afară prin porţiunea posterioară foarte ascuţită, transformîndu-se în flageli liberi. Ei dau impresia falsă a existenţei unui axostil.

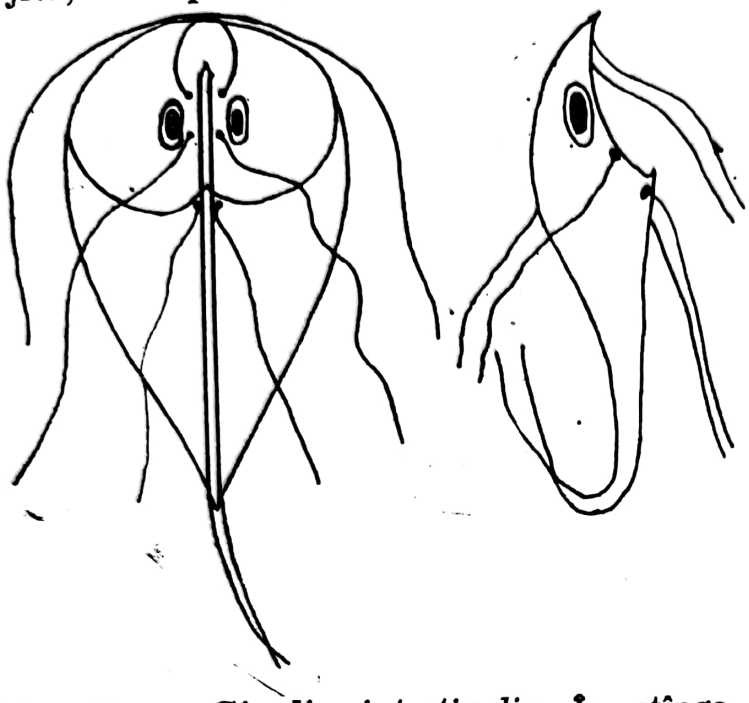


*Fig. 48. — Giardia intestinalis.* În stînga, forma vegetativă, privită pe faţa ventrală. În dreapta, de profil.

Sub discul anterior se pot găsi nişte formaţii colţuroase curioase denumite corpi parabazali. Parazitul se înmulţeşte prin diviziunea binară longitudinală.

El trăieşte în duoden şi rareori poate pătrunde şi în căile biliare. Se elimină foarte rareori în scaune, sub forma vegetativă descrisă. În asemenea cazuri e vorba, fie de un tranzit foarte accelerat al intestinului subţire, fie de un habitat neobişnuit, constînd dintr-o colonizare şi a porţiunii inferioare a tubului digestiv.

Ceea ce întîlnim însă în general în scaune sînt formele de rezistenţă, chisturile. Ele sînt ovoidale. Măsoară 10—13 microni, pe 8—9 microni. Înăuntrul lor se văd — după colorarea cu lugol — cele 2 nuclee la unul din poli, sau 4 nuclee (atunci cînd a început diviziunea parazitului în chist). Cînd sînt 4 nuclee, acestea pot fi găsite toate la acelaşi pol sau 2 la un pol şi 2 la celălalt. Coaja chistului apare de obicei foarte net, prin aceea că masa protoplasmatică e uşor retractată şi lasă un spaţiu între ea şi peretele chistului. Înăuntrul chistului, în afară de nuclee se văd şi flagelii, strînşi de obicei în mănunchi şi ocupînd în lungul chistului o poziţie diagonală. Se văd, de asemenea, uneori şi corpi parabazali.



Scanned with OKEN Scanner

Ceea ce trebuie reţinut este faptul că eliminarea chisturilor nu se face în mod continuu. Există perioade negative de eliminare a lor, ceea ce înseamnă că în caz de rezultat negativ examenul coproparazitologic al scaunului trebuie repetat de mai multe ori, la

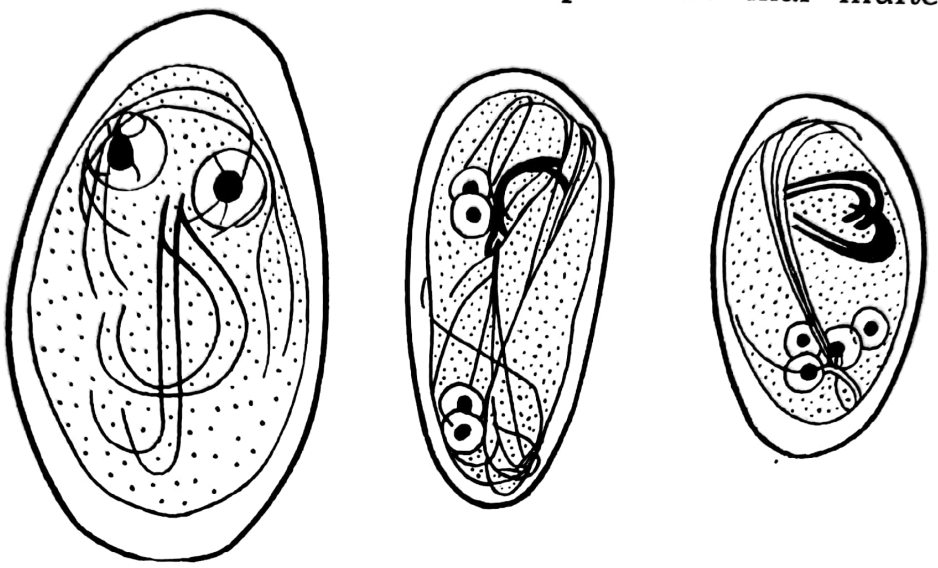


*Fig. 49.* — Chisturi de *Giardia intestinalis*. Cel din stînga, în parte, după C. M. Wenyon. Cele din dreapta, după Kofoid şi Swezy.

intervale de 6—10 zile, pentru a încăleca asemenea perioade negative.

Unele chisturi de *Giardia* se colorează cu lugol în albastru grizatru. Aceste chisturi albastre, sînt probabil moarte şi degenerate. Sînt în general mai mici şi de multe ori nu mai prezintă nuclee.

Cultura parazitului nu reuşeşte pe nici unul din mediile utilizate pentru cultivarea celorlalte protozoare. A. E. Karapetian a propus un mediu foarte complex, care dă multe speranţe, dar la care se lucrează încă pentru a-l perfecţiona. Citǎm în special cercetările pe care la fac în prezent prof. E. A. Meyer şi colaboratorii săi.

*Giardia intestinalis* are un rol patogen cert. De aceea în toate cazurile de tulburări gastrointestinale, cu participarea duodenului, trebuie căutată cu grijă — prin examenul coproparazitologic — prezenţa eventuală a chisturilor de giardie. Din cauza perioadelor negative de eliminare a lor, examenul trebuie repetat de mai multe ori.

## Sporozoare. Coccidii

Coccidiile sînt sporozoare care îşi îndeplinesc ciclul lor evolutiv de viaţă în celulele epiteliale din intestin sau căile biliare. Din acest ciclu rezultă nişte formaţii, în general ovalare, numite oochisturi, reprezentînd produsul de contopire al gametului mascul



Scanned with OKEN Scanner

cu gametul femel. Oochisturile sînt eliminate cu materiile fecale în mediul extern, unde îşi vor continua evoluţia, în sensul că din unica sa celulă vor rezulta 2 sau 4 formaţii globuloase (sporoblaştii), care se transformă curînd în sporochisturi, iar în interiorul fiecărui sporochist se vor dezvolta 2 sau 4 sporozoiţi. Aceste din urmă elemente reprezintă ultima treaptă a evoluţiei sexuate a unei coccidii. Ele sînt infestante — adică sînt capabile să reînceapă ciclul de viaţă al parazitului în gazdele susceptibile de a primi dezvoltarea lor — dacă sînt introduse cu alimentaţia în tubul digestiv al acestor gazde.

Ceea ce întîlnim noi în materiile fecale, la examenul coproparazitologic, sînt oochisturi încă nesegmentate. Pentru a ne da seama cărui gen de coccidie aparţin, este necesar de a le supune la coprocultură şi a urmări dezvoltarea lor ulterioară. Dacă înăuntrul lor se vor forma 2 mase sporochistice şi în fiecare din ele cîte 4 sporozoiţi — va fi vorba de genul *Izospora*. Dacă se vor forma 4 mase sporochistice şi în fiecare din ele cîte 2 sporozoiţi — va fi vorba de genul *Eimeria*.

La om paraziteză 2 specii a genului Izospora : *Isospora belli* şi *Isospora hominis*.

**Isospora belli.** Oochisturile sînt mici, puţin refringente şi scapă adesea observaţiei unui cercetător neatent. Poate că de aceea numărul de cazuri de izosporoză umană semnalat e relativ mic. Clasic aceste oochisturi sînt descrise a avea o formă ovalară — dar ovalul este deformat printr-o gîtuitură la unul din poli. Măsoară în lungime 25—30 de microni, pe o lărgime care este, în general, jumătate din lungime. Există însă — spune Wenyon — posibilitatea existenţei de forme mai groase, la care raportul între lungime şi lăţime să fie sub 2 (fig. 50).

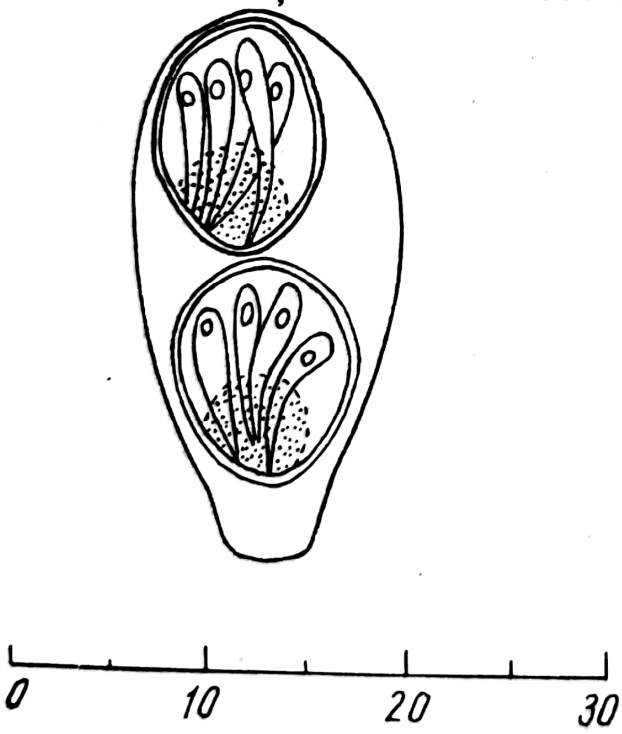



*Fig. 50. — Isospora belli.* Oochistul segmentat (disporocistid tetrazoic).

Unul din noi, împreună cu dr. Justina Ţînţăreanu, am studiat în 1961 un număr de 7 cazuri de izosporoză. Oochisturile măsurau 23—24 de microni, pe 9—13 microni. Existau oochisturi mult mai alungite, la care raportul lungime/lăţime era mai mare de 2 (2,55). În acelaşi



Scanned with OKEN Scanner

timp nu la toate chisturile se putea vedea gîtuitura la un pol, considerată drept caracteristică speciei *Isospora belli.* Noi am atribuit totuşi acestei specii chisturile găsite în cele 7 cazuri, ca fiind diagnosticul cel mai apropiat faţă de datele sistematice existente. Dar e posibil ca o revizuire a sistematicii coccidiilor să aducă unele date noi.

Iată de ce, aşa ca în articolul citat mai sus, continuăm a recomanda şi acuma studierea mai atentă a oochisturilor de *Isospora* găsite, atît în ceea ce priveşte mărimea, cît şi forma lor, şi prezenţa sau nu a acelei gîtuituri la un pol, semnalată de autori, pentru a se strînge în felul acesta un material util pentru o viitoare revizuire sistematică a speciilor genului *Isospora.*

**Isospora hominis.** La această specie, în general nu se găseşte la examenul coproparazitologic oochistul, ci numai sporochişti, fie izolaţi, fie îngemănaţi cîte 2 şi, uneori complet evoluaţi în cei 4 sporozoiţi. Aceste sporochisturi au dimensiunile de 15 pe 10 microni.

*I. hominis* e strîns înrudită cu *I. bigemina* de la cîine şi pisică. Legăturile care au fost descoperite recent între toxoplasmoză şi o izosporoză intestinală a pisicii aduc un nou interes studiului acestei specii şi atenţiei cu care trebuie urmărite forma şi dimensiunile sporochisturilor ce pot fi eventual găsiţi la analizele coproparazitologice.

**Coccidii de trecere.** În afară de cele 2 specii de *Isospora* menţionate mai sus, examenul coproparazitologic poate arăta prezenţa de numeroase forme de oochisturi de coccidii — care să nu reprezinte paraziţi ai omului, ci numai „oochisturi de trecere", şi să aparţină la specii şi genuri de coccidii ale diferitelor animale domestice sau sălbatice, ale căror viscere au fost ingerate de indivizii respectivi (conserve de peşte, scrumbii sau sardele, viscere de iepure sau de alte animale, vînat etc.).

În asemenea cazuri este necesar a se face întîi investigaţii asupra alimentaţiei pe care aceşti indivizi au avut-o înaintea examenului coprologic şi a-i supune unui regim lactat, după care vom repeta noi examene, înainte de a putea afirma că ar fi vorba de o coccidioză umană necunoscută. Găsirea la examen şi a unor forme prea tinere sau prea evoluate de coccidii pledează, de asemenea, pentru parazitismul „de trecere".

## Ciliate

Din această clasă o singură specie poate fi considerată în mod cert parazită a omului : **Balantidium coli.** Este un infuzoriu mare, care — după cum arată şi numele — trăieşte în colon. Posedă un



Scanned with OKEN Scanner

corp ovalar mai atenuat în partea anterioară. Poate depăşi în lungime 100 de microni. Lărgimea e în general o treime din lungime. Se mişcă cu vioiciune în cîmpul microscopic, datorită numeroşilor cili vibratili care-i învelesc tot corpul, şi nu e cu putinţă să scape observaţiei, chiar pentru un cercetător mai puţin atent.

În partea anterioară prezintă un şanţ adînc peristomal, de la capătul posterior al căruia se înfundă în endoplasm orificiul bucal. Şanţul ocupă în lungime o treime din lungimea protozoarului. În partea posterioară a corpului există un orificiu anal, dar numai funcţional, adică apare şi funcţionează numai în anumite momente, servind la eliminarea dejectelor. Corpul e acoperit cu o membrană prevăzută cu numeroşi cili vibratili, dispuşi regulat pe linii longitudinale, care însă respectă o anumită oblicitate. În jurul şanţului peristomal cilii sînt cu mult mai mari.

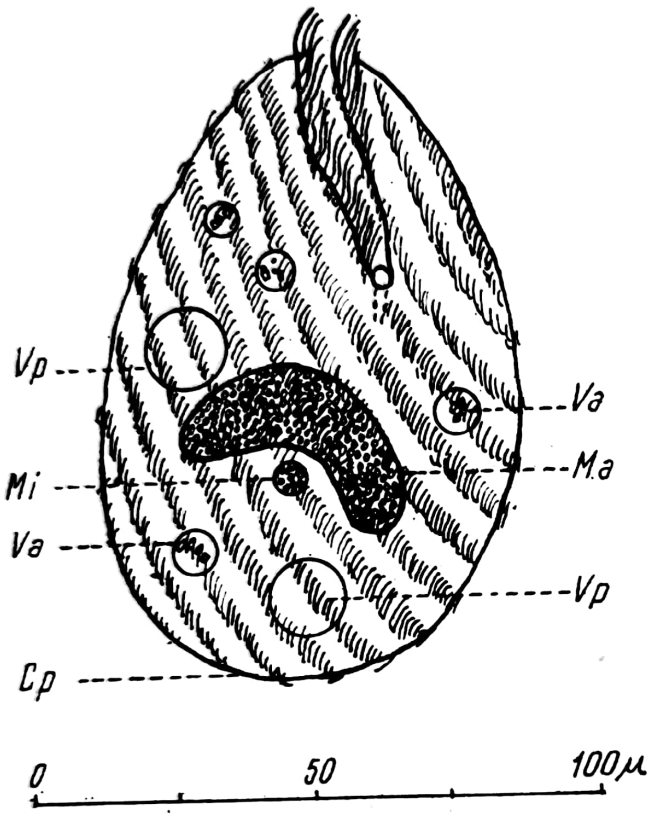



*Fig. 51. — Balantidium coli* (desen schematic). *Ma* = macronucleu; *Mi* = micronucleu; *Vp* = vacuolă pulsatilă; *Va* = vacuolă alimentară; *Cp* = orificiu anal.

Protoplasma care alcătuieşte corpul parazitului are o pătură externă subţire, la suprafaţă (ectoplasma), care acoperă pătura internă (endoplasma). În endoplasmă găsim nucleul, 2 vezicule pulsatile şi numeroase vacuole alimentare. Nucleul se compune din 2 corpi nucleari, avînd funcţii deosebite: un nucleu mare, reniform (macronucleul), şi unul mic, sferic, situat în concavitatea macronucleului. Acesta e micronucleul, a cărui principală funcţie e reproducerea. Vacuolele pulsatile, totdeauna prezente, sînt dispuse una în apropierea nucleului şi alta în regiunea posterioară (fig. 51).

Parazitul se hrăneşte cu floră şi faună intestinală. Alimentele sînt introduse prin citostom. Există şi cazuri de canibalism — în care un *Balantidium* mare ingerează pe unul mic. Se poate hrăni şi cu sînge, pe care-l poate găsi întîmplător în cavitatea intestinală, dar pe care îl poate obţine şi în mod activ introducîndu-se în gro-



Scanned with OKEN Scanner

simea mucoasei şi submucoasei unde creează abcese mari, asemănătoare ca înfăţişare (dar mai adînci) cu cele produse de *Entamoeba histolytica*. Pot exista în consecinţă atacuri de dizenterie balantidiană comparabile (dar cu mult mai grave) cu acelea de dizenterie amibiană. Rezultă că dacă parazitul se poate menţine în intestin ca un simplu incolin (şi o face de cele mai multe ori), el poate fi şi patogen şi poate chiar provoca moartea gazdei sale.

Parazitul se divide prin sciziune binară transversală, spre deosebire de flagelate, care se divid longitudinal. În această diviziune cei 2 balantidii-fii nu sînt deloc asemănători la începutul procesului, întrucît unul singur va poseda citostom, care se va forma apoi şi la celălalt individ. Se descrie la *Balantidium coli* şi existenţa unei regenerări sexuate, în care 2 indivizi se apropie, îşi contopesc temporar regiunea anterioară şi suferă o contopire a unei părţi a micronucleului unuia cu o parte corespunzătoare a micronucleului celuilalt, proces cunoscut la mulţi infuzori liberi.

Parazitul poate produce chisturi mari, rotunde, cu un dublu perete. Măsoară 60 de microni. În ele se găseşte cîte un singur individ. Acesta e contractat, aşa că rămîne un spaţiu liber între el şi peretele chistului. Se vede bine în chist macro- şi micronucleul. Unii autori au descris şi contopirea a 2 indivizi în acelaşi chist. Chisturile sînt foarte rezistente. Pot trăi 2 luni la temperatura camerei, în mediu umed. În mediu uscat rezistă 1—2 săptămîni la umbră şi numai cîteva ore la soare (Pavlovski) (fig. 52).

Porcul este parazitat cu un infuzoriu asemănător, care se comportă la această gazdă ca un incolin bine tolerat. Morfologic *Balantidium coli* de la om şi de la porc sînt identici şi cei mai mulţi autori sînt de părere că este vorba de una şi aceeaşi specie. În cazul acesta porcul trebuie considerat ca rezervorul de infestaţie pentru balantidioza umană şi de cele mai multe ori anamneza cazurilor de dizenterie balantidiană umană arată că bolnavii respectivi au venit în prealabil în contact cu material intestinal porcin (cîrnăţari, mezelari, bucătari).

**Balantidium minutum** (fig. 53). Acest infuzor a fost găsit întîi în scaunele diareice ale unui marinar. Ulterior a mai fost semnalat într-un număr restrîns de cazuri. Din punct de vedere morfologic se deosebeşte de *Balantidium coli* prin următoarele caractere :

— *mărime :* nu măsoară decît 30 de microni ;

— *dispoziţia cililor :* sînt dispuşi neregulat pe suprafaţa corpului ;

— *şanţul peristomal :* este mai lung, ajungînd pînă la jumătatea corpului ;

— *macronucleul :* este rotund :

— *chistul :* este ovoid şi nu sferic.



Scanned with OKEN Scanner

Există discuții dacă *B. minutum* trebuie sau nu să fie considerat ca un adevărat parazit al omului. El ar putea fi lipsit de orice rol patogen și ar putea fi doar un infuzor coprozoic.

Se înțelege prin infuzor coprozoic acela care se dezvoltă în materiile fecale, datorită unor chisturi pătrunse acolo întîmplător

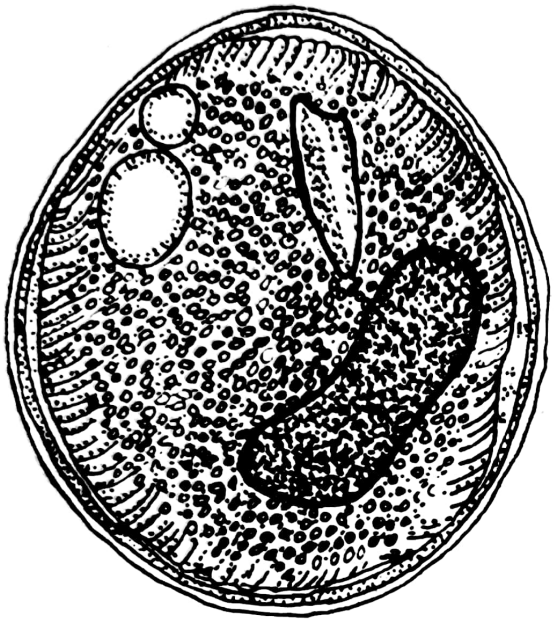


*Fig. 52. — Balantidium coli.* Chistul (după Dobell și O'Connor).

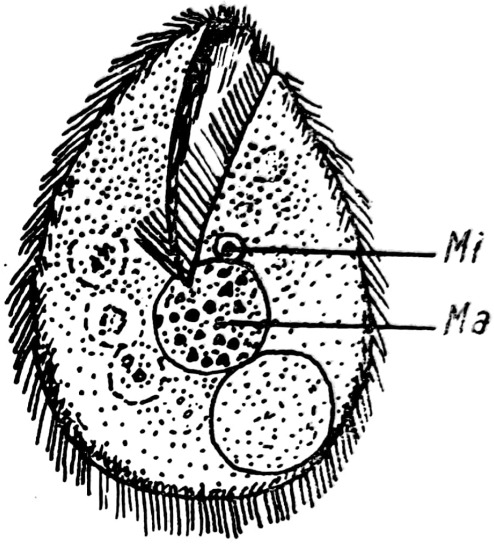



*Fig. 53. — Balantidium minutum* (după Schaudinn). *Ma* = macronucleu; *Mi* = micronucleu.

din mediul înconjurător sau care au putut fi ingerate de persoana respectivă, au fost eliminate odată cu materiile sale fecale și au eclozat în aceste materii. După eclozare infuzorul s-a putut înmulți în mediul care îi e prielnic, fără să fi fost nici un moment vorba de viață parazită în intestin.

Este drept însă că persoanele la care a fost semnalată prezența de *B. minutum* au suferit de tulburări digestive.

La fel cu *B. minutum* a mai fost semnalată prezența în materiile fecale ale omului și a altor infuzorii, care sînt azi considerați că ar intra în categoria infuzorilor coprozoici, și anume : *Nictoterus faba, Colpoda cucullus, Colpoda steini* (fig. 54), *Chilodon dentatus, Chilodon uncinatus, Uronema caudatum* (fig. 55).

Deoarece persoanele la care au fost găsiți infuzorii de mai sus aveau tulburări enteritice, s-ar putea să fi fost vorba de un parazitism accidental cu ciliate în mod obișnuit libere, dar care s-au putut menține și chiar înmulți o bucată de vreme în intestin, da-



Scanned with OKEN Scanner

torită unor condiţii speciale provocate de alte cauze (o rezistenţă scăzută a tubului digestiv).

Concluzia celor de mai sus este însă că nu trebuie considerat *Balantidium coli* ca singurul ciliat susceptibil a fi găsit în tubul digestiv sau în examenul coproparazitologic. De aceea, în cazurile

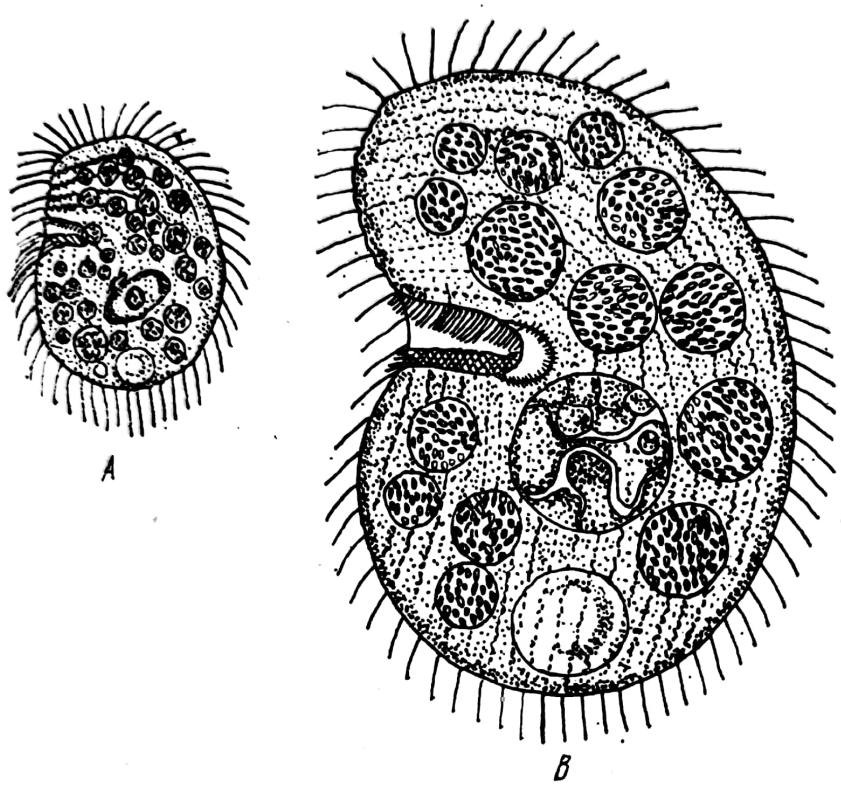



*Fig. 54.* — A = *Colpoda steini.* B. — *Colpoda cucullus* (după C. Wenyon).

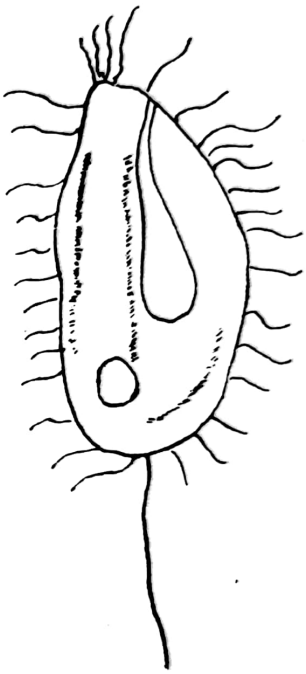


*Fig. 55.* — *Uronema caudatum* (după E. Martini).

în care găsim un ciliat, el trebuie urmărit cu atenţie şi identificat pe baza caracterelor sale morfologice, după colorare cu hemalaun-eozină. Pentru a fi diagnosticat ca *Balantidium coli* el trebuie să posede toate caracterele proprii ale acestei specii.

## Helminţi

### Cestode

Pot fi întîlnite dintre cestode :

1. Două tenii mari : *T. solium* şi *T. saginata.*
2. Un botriocefal : *Diphyllobothrium latum.*
3. Un cestod foarte mic : *Hymenolepis nana.*



Scanned with OKEN Scanner

Excepţional, se pot întîlni :

4. *Hymenolepis diminuta.*

5. *Dipylidium caninum.*

**Taenia solium** şi **Taenia saginata.** Ambii paraziţi — ca toate cestodele — reprezintă colonii liniare de indivizi, — sub formă de segmente, fiecare din ele avînd o organizaţie hermafrodită. Cînd viermele a ajuns la o anumită lungime, segmentele de la sfîrşitul lanţului se desprind, unul cîte unul, şi sînt eliminate, în timp ce în locul lor regiunea gîtului formează noi segmente care regenerează viermele.

Or, ultimele segmente, acelea care se desprind şi sînt în curs de eliminare, pot fi găsite în masa fecală. Uneori bolnavul le culege din materii şi le aduce la laborator pentru identificare. Ele au o mărime variabilă între 1,5 şi 2—3 cm. Sînt mult mai lungi decît late şi prezintă, pe una din părţi, o mică ridicătură — papila genitală. Prima problemă care se pune este cum se pot deosebi una de alta cele două specii de tenie, pe baza ultimelor segmente.

În aceste ultime segmente se mai găseşte doar uterul plin cu ouă. Celelalte organe ale aparatului reproducător hermafrodit s-au atrofiat şi au dispărut. Dar uterul rămas e suficient de caracteristic pentru a deosebi cele 2 tenii. El se prezintă în esenţă ca un tub median, care dă pe lături, de o parte şi alta, ramuri transversale, care la rîndul lor se subdivid în alte ramuri. La *T. solium* ramurile transversale sînt puţin numeroase — în general nu mai mult de 10 de fiecare parte — iar diviziunea lor secundară e foarte capricioasă, asemuită cu aceea a ramurilor unui copac (diviziune dendritică). La *T. saginata* ramurile transversale sînt cu mult mai numeroase (cca. 20 de fiecare parte) şi fiecare se divide secundar în tot cîte 2 (diviziune dicotomică) (fig. 56 şi 57).

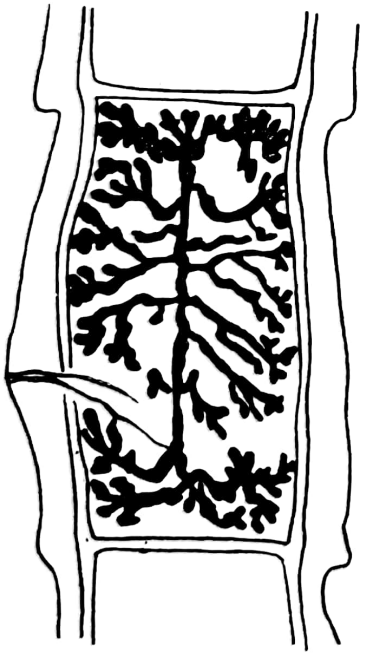


*Fig. 56.* — Segment bătrîn de *Taenia solium* (după F. Sommer).

Pentru a putea să se vadă mai bine aceste ramuri ţinem cîtva timp segmentele respective în glicerină cu acid acetic concentrat (în părţi egale) sau în lactofenol.

Al doilea element susceptibil a fi întîlnit în analizele coproparazitologice e oul de tenie. Găsirea de ouă e relativ rară, întrucît acestea sînt înmagazinate în ultimele segmente şi se elimină în mediul extern, odată cu segmentele. Dar există cazuri în



Scanned with OKEN Scanner

care segmentele bătrîne cu ouă, se rup de aşa manieră încît şi ramificaţiile uterine sînt lezate. Din ele se poate scurge atunci în intestin un număr mai mare sau mai mic de ouă. Aşadar, la analiza coproparazitologică se pot găsi şi ouă de tenia izolate. Pe de altă parte, în special atunci cînd e vorba de *T. saginata,* ale cărei segmente bătrîne reuşesc să forţeze sfincterul anal şi să se elimine între scaune, în cursul frecării segmentelor de mucoasa anală pot rămîne pe această mucoasă un număr uneori însemnat de ouă, care pot fi găsite prin metoda celofanului adeziv.

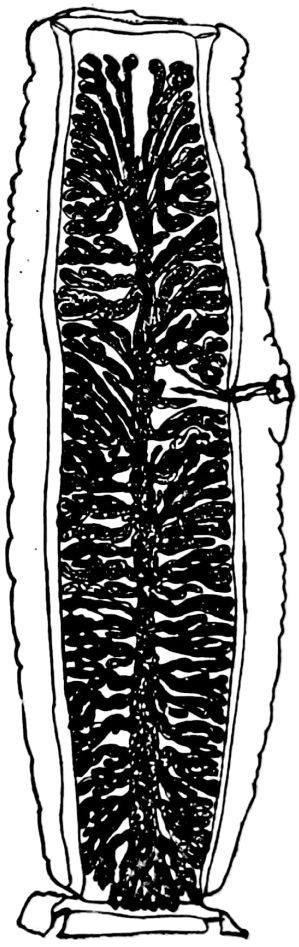


*Fig. 57.* — Segment bătrîn de *Taenia saginata* (după F. Sommer).

Oul posedă o coajă groasă, care prezintă striaţii radiale foarte caracteristice. În realitate coaja striată radial nu reprezintă oul în întregime, ci numai acea parte din el care conţine embrionul, motiv pentru care adevăratul său nume e acela de „embrioforˮ. Oul conţinut în uter posedă în plus resturi viteline cu care, împreună cu embrioforul, e învelit de o membrană ovulară. Dar această membrană e foarte fragilă şi dispare atunci cînd oul se liberează şi ajunge în mediul extern. În consecinţă, ceea ce găsim în mod obişnuit în analizele coproparazitologice nu sînt propriu-zis „ouă de tenieˮ, ci „embriofori de tenieˮ.

Embrionul, care se găseşte înăuntrul cojii striate radial, posedă 6 cîrlige. De aceea se numeşte *embrion hexacant.* El reprezintă elementul infecţios al oului.

În ceea ce priveşte forma şi dimensiunile embrioforilor celor două specii de tenie, Rondeau du Noyer, în teza sa de doctorat consacrată studiului cestodelor omului, dă următoarele cifre :

— *Taenia solium :* ouă sferice, rar ovoide, măsurînd 42 de microni în diametru ; grosimea cojii striate : 7—8 microni ;

— *Taenia saginata :* ovoide, rar sferice, avînd 45—48 de microni pe 43—45 de microni ; grosimea cojii striate : 5 microni (fig. 58).

Cifrele date de Rondeau du Noyer nu concordă cu cele date de alţi autori. Aceasta din cauză că există multe variaţii individuale care au dus, la diferiţii autori, la aprecieri variate. În orice



Scanned with OKEN Scanner

caz, socotim că nu se poate face deosebirea între *T. solium* şi *T. saginata* pe baza dimensiunilor sau a formei embrioforilor — în special atunci cînd nu avem înainte un material foarte bogat, care să ne permită a face o medie. Chiar şi Rondeau du Noyer

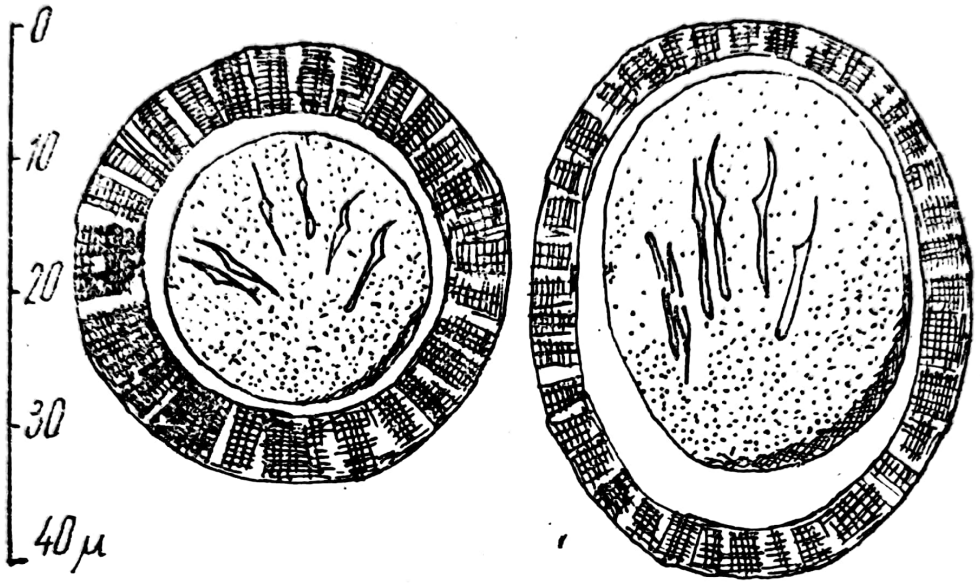



***Fig. 58.*** — Embriofori de ***Taenia.*** În stînga, ***Taenia solium,*** în dreapta, ***Taenia saginata*** (după M. Rondeau du Noyer).

spune că pot exista embriofori rotunzi la *T. saginata* şi ovalari la *T. solium.* Pe baza unui material sărac cu embriofori de tenie rari, aşa cum se găseşte la examenul coproparazitologic, e mai bine să ne abţinem de la precizarea speciei pe baza mărimii şi formei lor şi să ne mulţumim prin a nota : embriofori de tenie.

Aceste 2 mari panglici se deosebesc şi prin scolexul lor. Scolexul prezintă la *T. solium* un rostru bine dezvoltat, înconjurat de 2 coroane de croşete (fig. 59). La *T. saginata* rostrul, dacă există, este rudimentar şi croşetele lipsesc (fig. 59 şi 60).

**Diphyllobothrium latum** sau botriocefalul (fig. 61). Este panglica luată din carnea şi icrele de peşte în care trăiesc formele infestante, numite şi *plerocercoizi.* Spre deosebire de tenie, botriocefalul posedă pe fiecare segment capabil de a produce ouă un orificiu de ouat, care permite eliminarea ouălor în conţinutul intestinal. Ca o consecinţă, dacă în cazul teniazei aveam rareori ocazia să întîlnim ouă în scaune, în cazul botriocefalozei ouăle se găsesc



Scanned with OKEN Scanner

în mod regulat şi, ceva mai mult, ele se găsesc totdeauna într-o cantitate aşa de mare, încît pot fi puse în evidenţă chiar la un simplu examen direct. Nu numai atît, dar prezenţa unui număr mare de ouă este obligatorie. Atunci cînd găsim la examinarea printr-o

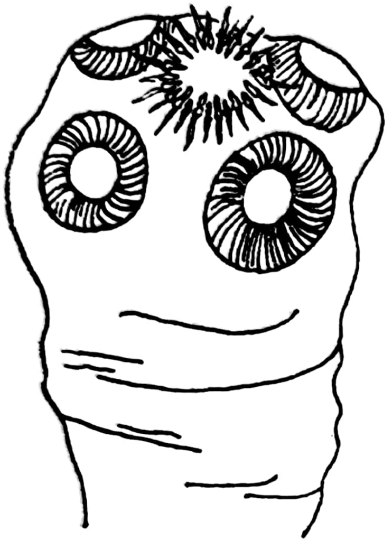


*Fig. 59.* — Scolex de *Taenia solium*

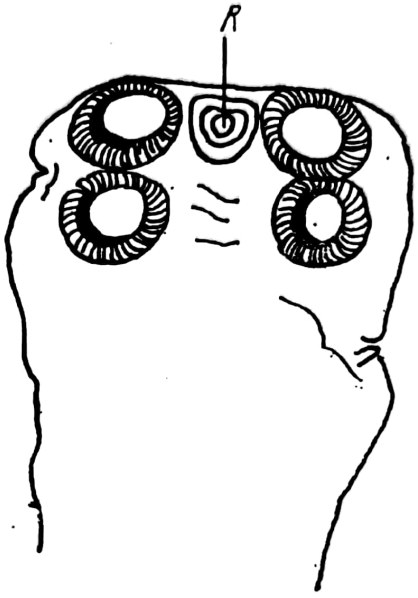



*Fig. 60.* — Scolex de *Taenia saginata.*

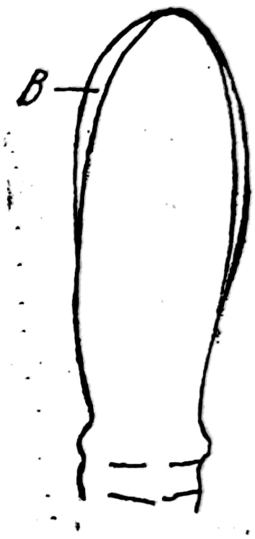



*Fig. 61.* — Scolex de botriocefal.
B — botridie.

metodă de concentrare un număr foarte redus de ouă — unul, două, trei — nu este vorba de botriocefaloză, ci de condiţii necorespunzătoare în care a fost făcută cercetarea, în sensul că sticlăria nu a fost corect spălată şi acele puţine ouă au rămas pe sticlărie de la o analiză efectuată anterior.

Oul de *Diphyllobothrium latum* are o formă ovalară. Măsoară 70 de microni, pe 45 de microni. Are o coajă netedă, de o culoare galben-brună şi este prevăzut cu un căpăcel la unul din cei 2 poli ai ovoidului ; la polul opus poate prezenta, cîteodată, un foarte mic pinten. Înăuntru se găseşte celula-ou, înconjurată de numeroase celule viteline (fig. 62).

La botriocefal nu se găsesc în scaune ultimele segmente. Ele, înainte de a se desprinde şi a fi eliminate, se golesc de ouă, se ratatinează şi devin de nerecunoscut. Se întîmplă însă adesea ca din cînd în cînd purtătorii de botriocefal să elimine o bucată lungă de strobilă (o înşiruire de segmente). Bolnavii o aduc la laborator



Scanned with OKEN Scanner

pentru identificare. Două caractere ne ajută să identificăm strobila de botriocefal :

1. faptul că toate segmentele sînt cu mult mai late decît lungi ;

2. faptul că o dungă închis colorată străbate în tot lungul acestei înşiruiri de segmente. Această dungă reprezintă înşiruirea rozetelor uterine (tubul uterin plin cu ouă încolăcit de mai multe

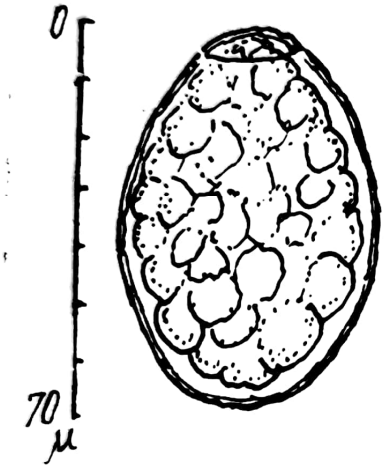



*Fig. 62.* — Ou de botriocefal (după M. Rondeau du Noyer).

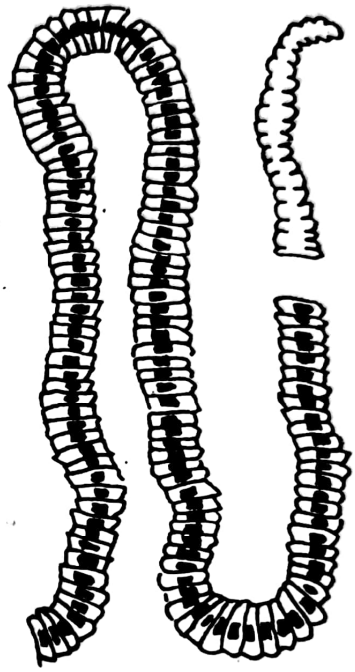


*Fig. 63.* — Strobilă de botriocefal (în J. Guiart).

cri, sub forma unei rozete). Acestea se găsesc pe mijlocul fiecărui segment şi se repetă, în continuare, de la un segment la altul (fig. 63).

**Hymenolepis nana.** Este panglica pitică a omului. Într-adevăr, întregul lanţ de numeroase segmente nu măsoară mai mult de 3—4 cm. Fiecare segment este mult mai lat decît lung. Uterul fiecărui segment este un organ închis, fără comunicare cu exteriorul. Segmentele bătrîne sînt foarte fragile. Ele se distrug în intestin şi, în felul acesta, ouăle sînt puse în libertate. În hymenolepidoză, în consecinţă, vor putea fi găsite ouăle respective şi, uneori, chiar foarte numeroase ouă în materiile fecale. Acestea au o înfăţişare caracteristică. Forma lor e uşor ovalară, măsurînd în diametru mai mult de 55—60 de microni. Un al doilea înveliş intern, măsoară 35—40 de microni şi posedă două proeminenţe mici, polare, de la care pleacă nişte flageli lungi, care plutesc în spaţiul dintre cele 2 învelişuri. În învelişul intern se



Scanned with OKEN Scanner

găseşte embrionul hexacant, cu cele 6 cîrlige caracteristice. Aceste ouă sînt foarte uşoare şi pot apărea cu uşurinţă în toate metodele de flotaţie.

În unele cazuri, în special cînd hymenolepidoza este pe cale de vindecare spontană (se întîmplă uneori la copii în epoca pubertăţii, sau după unele medicamente, care alterează cisticercoizii din vilozităţile intestinale) ca de exemplu dietilcarbamazina, apar ouă degenerate. I. Gherman e acela care a atras atenţia asupra importanţei ouălor degenerate în prognosticul hymenolepidozei. Asemenea ouă prezintă deformări de tot felul, începînd cu poziţia croşetelor şi sfîrşind cu deformări ale membranelor de înveliş. Cum ouăle degenerate au o semnificaţie în sensul anunţării unor condiţii deficiente de dezvoltare pentru viermi, ceea ce poate duce la dispariţia spontană a parazitozei, e bine să fie semnalate pe buletinul de analiză, atunci cînd se găsesc.

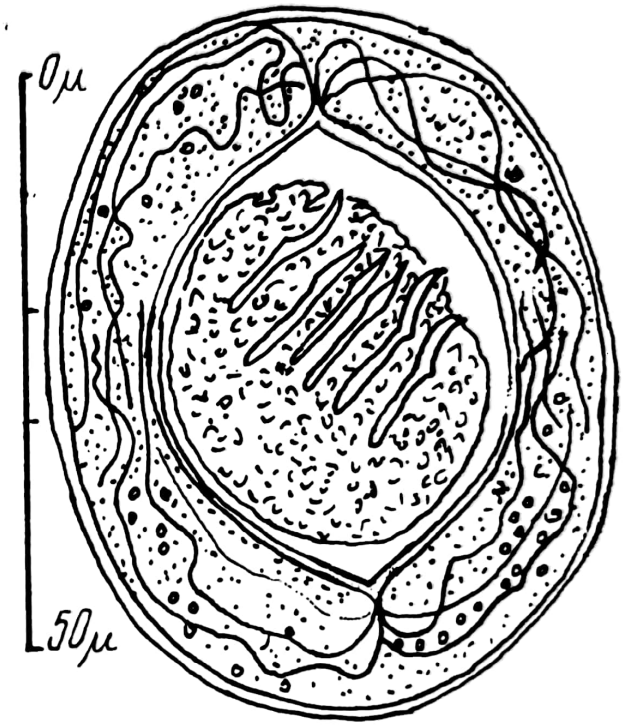



*Fig. 64.* — Ou de *Hymenolepis nana* (după M. Rondeau du Noyer).

Un vierme morfologic perfect asemănător cu *Hymenolepis nana* se poate găsi la şobolan şi şoarece şi poartă numele de *Hymenolepis fraterna*. Sînt încă discuţii dacă este sau nu vorba de unul şi acelaşi parazit. E mult mai probabil că este vorba de specii ecologice deosebite. Se pot totuşi obţine în unele cazuri — în special în avitaminoze — infecţii încrucişate, ceea ce înseamnă că şi aceste două rozătoare pot interveni, în anumite împrejurări, ca rezervor de infestaţie pentru hymenolepidoza umană.

*Hymenolepis nana* se transmite de la om la om direct prin ouă, fără a mai fi nevoie de interpunerea unei gazde intermediare, cum era cazul în teniază şi botriocefaloză.

**Hymenolepis diminuta.** Este o panglică care are o organizaţie asemănătoare cu aceea a lui *Hymenolepis nana*, dar e mult mai mare. În mod obişnuit parazitează la şobolani. Poate ajunge la 30—60 cm lungime, pe o lăţime de 3—4 mm. Produce ouă relativ



Scanned with OKEN Scanner

mari, sferice sau uşor ovalare, care măsoară 75—85 de microni în diametru. Prezintă două învelişuri. Unul extern, cu striaţii radiale, dar mult mai subţire ca învelişul embrioforilor de tenie, şi unul intern, ovalar, măsurînd 30—40 de microni. Înăuntrul lui se găseşte embrionul cu cele 6 cîrlige. Învelişul intern poate poseda uneori una sau două îngroşări polare, dar nu posedă flagelii caracteristici speciei precedente (fig. 65).

Acest ou nu evoluează direct la şobolan, ci are nevoie de o gazdă intermediară, care e de obicei o insectă de făină, ca *Tenebrio molitor* (gîndacul de făină) sau *Asopia (Pyralis) farinalis* (fluturele de făină). Poate servi ca o gazdă intermediară şi puricele de şobolan *Ceratophyllus fasciatus* sau *Xenopsila cheopis.* În cavitatea generală a acestor insecte se poate găsi un număr mai mare sau mai mic de forme larvare ale parazitului *Hymenolepis diminuta.* Şobolanul se infestează ingerînd aceste insecte.

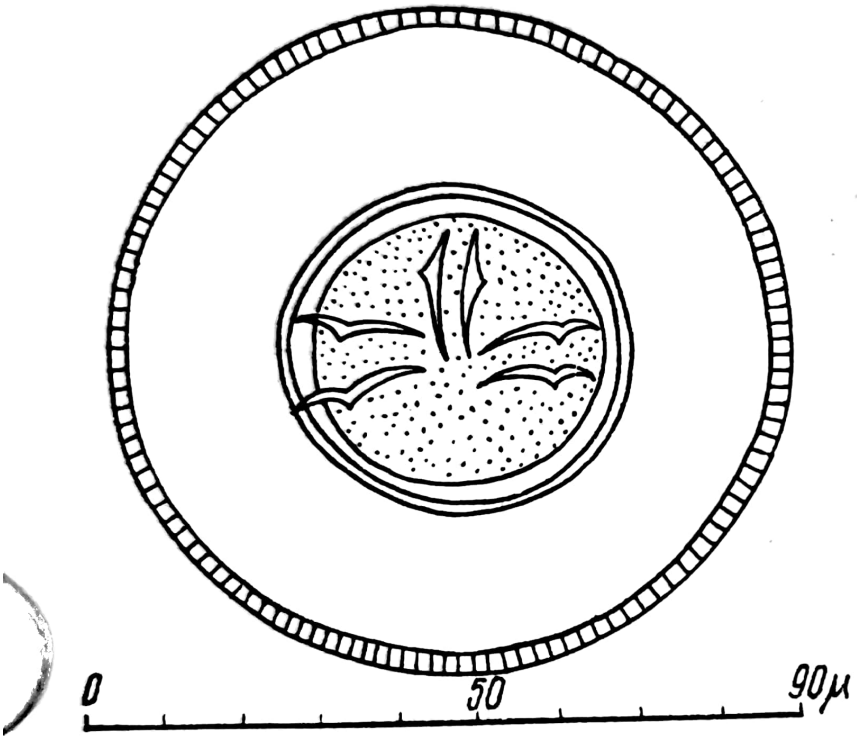



*Fig. 65. — Ou de Hymenolepis diminuta.*

Parazitul se poate însă găsi, excepţional, şi la om. La clinica de parazitologie, sub conducerea unuia din noi, au fost găsite pînă în prezent 20 de asemenea cazuri. Faptul însă că în două dintre aceste cazuri numărul de exemplare găsite la un acelaşi copil era foarte ridicat (într-un caz 27 de exemplare, în altul 49 de exemplare) a făcut pe Nitzulescu şi colab. să emită ipoteza că *Hymenolepis diminuta* ar putea avea în anumite împrejurări şi o evoluţie directă prin ouă, deoarece ingerarea unui aşa de mare număr de larve infecţioase, care să fi produs atîţia paraziţi, implică ingerarea unui număr prea mare de gazde intermediare, ceea ce e mai greu de imaginat.

**Dipylidium caninum.** Este un parazit obişnuit al cîinelui, mai rar al pisicii ; la cîine ajunge la dimensiuni de 30—60 cm, la pisică, 15—30 cm. Caracterul principal al acestui cestod este acela că segmentele sale au o formă particulară de butoiaşe sau aceea de sămînţă de bostan, iar fiecare segment prezintă nu una, ci două



Scanned with OKEN Scanner

papile genitale (cîte una de fiecare parte). Ultimele segmente care părăsesc lanţul viermelui sînt foarte viguroase. Ele se pot elimina spontan, forţînd sfincterul anal. Se pot elimina şi odată cu scaunele.

În segmentele bătrîne ouăle se găsesc îngrămădite în pachete de cîte 15—20 de ouă (capsule uterine). De obicei segmentele nu eliberează ouăle conţinute cît timp se află în intestinul gazdei. De aceea, de cele mai multe ori, nu găsim ouăle la examenul coproparazitologic. Putem însă găsi foarte adesea în scaunele celor parazitaţi segmentele bătrîne întregi. Ele pot ajunge în lungime de 6—7 mm, pe o lăţime de 2—3 mm. Au o culoare roşiatică. Se văd cu uşurinţă cu ochiul liber, la suprafaţa masei fecale, dar pot fi confundate, de persoanele neprevenite, cu resturi vegetale şi neluate în seamă. Donald W. Moore şi Frank H. Connel arată că în unele din cazurile de dipilidioză umană pe care le-au studiat au găsit în scaune numeroase segmente mobile, dar n-au găsit nici capsule uterine, nici ouă izolate. O altă probă din aceeaşi masă fecală a fost lăsată la gheaţă pînă a 3-a zi cînd, spre surpriza lor, examenul macroscopic n-a mai arătat nici un segment de *Dipylidium*. Primul lor gînd a fost că între timp segmentele existente s-au autolizat şi au eliberat în materiile fecale capsulele pe care le conţineau. Dar examenul microscopic al masei fecale a rămas negativ. În schimb, în raclajul făcut de pe pereţii vasului în care fuseseră lăsate materiile fecale s-au găsit numeroase ouă şi capsule tipice, ceea ce dovedeşte că proglotele (segmentele) s-au ridicat pe pereţii vasului şi s-au dezintegrat acolo,

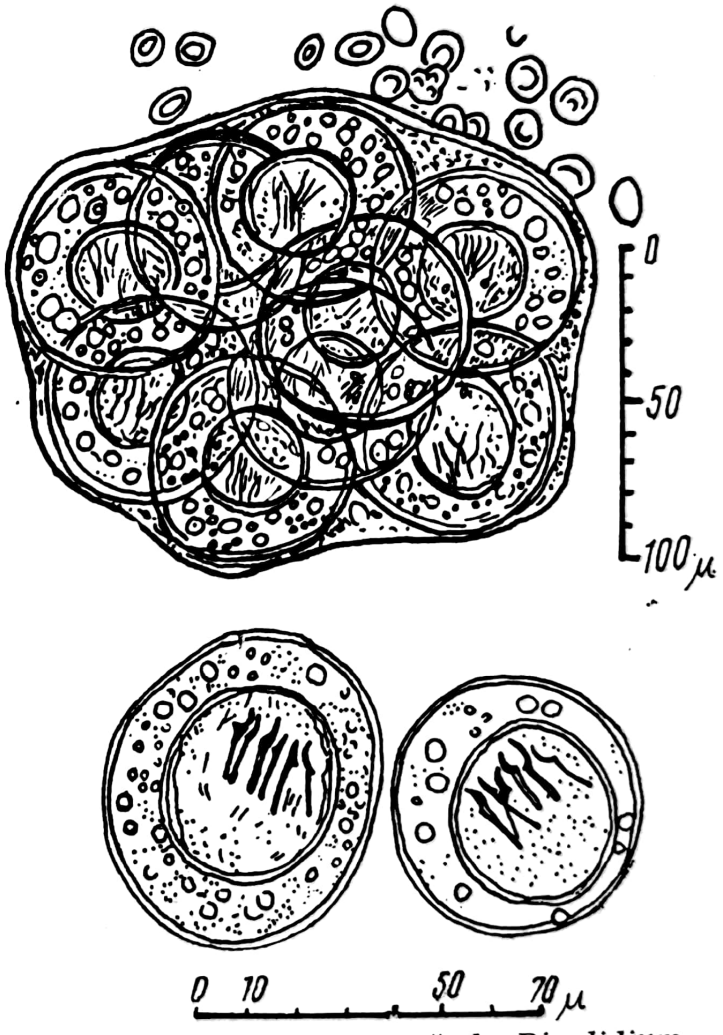



*Fig. 66.* — Capsulă cu ouă de *Dipylidium caninum*. Jos : 2 ouă izolate (după Rondeau du Noyer).



Scanned with OKEN Scanner

lăsînd ouăle pe pereţi. Ca o consecinţă, autorii de mai sus arată că e necesar a se examina şi pereţii vasului în care au fost ţinute materiile fecale, pentru a găsi proglote, capsule sau ouă.

Ouăle au o culoare roşcată, o formă sferică sau subsferică şi o mărime de 40—45 de microni. Au două învelişuri subţiri : unul exterior, de dimensiunile arătate, şi celălalt mai mic, care înveleşte embrionul cu cele 6 cîrlige ale sale. Dar caracterul cel mai important al acestor ouă e acela că sînt grupate, de cele mai multe ori, cîte 15—20, în capsule uterine.

Evoluţia viermelui se face printr-o insectă : puricele de cîine şi de pisică, puricele de om şi un malofag al cîinelui — *Trichodectes canis*. În cavitatea generală a acestor insecte se găsesc larvele infestante şi infecţia animalelor se produce prin ingerarea insectelor. Infecţia umană se produce la fel — prin ingerarea accidentală a insectelor purtătoare de larve infestante.

Cazurile umane sînt relativ rare. În cursul a 20 de ani nu am găsit la secţia clinică de boli parazitare din Bucureşti decît 2 cazuri, la copii foarte mici.

## Trematode

### *Distomieni cu habitat hepatic*

Din ordinul trematodelor şi subordinul distomienilor pot parazita în ficatul omului următoarele patru specii :

1. *Fasciola hepatica,*
2. *Dicrocoelium lanceolatum,*
3. *Opistorchis felineus,*
4. *Clonorchis sinensis.*

Primele 3 se pot găsi şi în ţară la noi. Cea de a patra este un parazit exotic. Se întîlneşte în China şi Extremul-Orient. Bolile produse de paraziţii de mai sus se denumesc cu nume derivate din denumirea genului din care face parte parazitul respectiv : fascioloză, dicrocelioză, opistorchoză, clonorhoză.

**Fasciola hepatica.** Este un vierme de aspect foliaceu (comparat cu o frunză cu peţiolul său). Măsoară 1,5—3 cm, pe o lăţime maximă de 13 mm. E mai lat în regiunea anterioară şi se atenuează progresiv spre regiunea posterioară. Regiunea anterioară este precedată de o prelungire (numită prelungirea cefalică) lungă de 3—4 mm. Posedă două ventuze, din care una numită ventuza orală, situată la extremitatea anterioară a prelungirii cefalice ; serveşte în acelaşi timp şi de orificiu bucal. Cealaltă e situată pe



Scanned with OKEN Scanner

fața ventrală a *Fasciolei,* dar foarte anterior. Parazitul posedă un tub digestiv foarte ramificat, dar închis posterior (deci fără orificiu anal), și un aparat reproducător hermafrodit. Spre deosebire de cestode, care reprezentau colonii liniare de indivizi, trematodele reprezintă indivizi izolați.

Parazitează în canalele biliare.

Se capătă prin ingerarea formelor larvare (cercarii) care se găsesc închistate pe unele vegetale din jurul bălților, în regiunile unde fascioloza hepatică bîntuie la vite și oi. Ouăle eliminate cu materiile fecale de animalele bolnave de fascioloză ajung în apă, unde eliberează embrioni. Aceștia urmează o evoluție complicată în țesuturile unor anumiți melci de apă, evoluție care implică o multiplicare asexuată și producerea a numeroase larve infestante, numite cercari. Cercarii se eliberează din țesuturile melcului și se închistează pe vegetalele din jurul bălții sau chiar în apa bălții în care s-au dezvoltat. Păscînd aceste vegetale, vitele și oile se infestează și ciclul de viață al parazitului reîncepe. Omul este o gazdă accidentală pentru *Fasciola hepatica.*

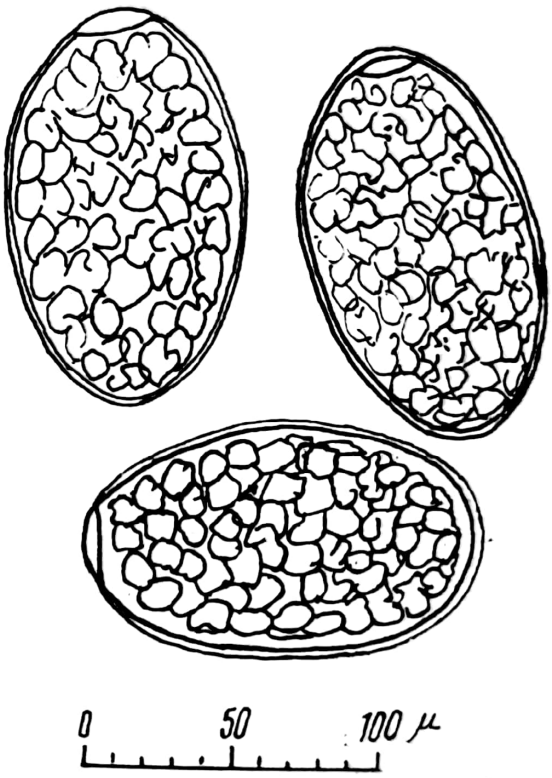


*Fig. 67. — Ouă de Fasciola hepatica.*

Larva infestantă, ingerată de gazda definitivă (om sau vite), trece în cavitatea peritoneală și de aici străbate în mod activ capsula lui Glisson, pătrunzînd în parenchimul hepatic. Din parenchim va pătrunde în canalele biliare, unde devine adultă și începe a produce ouă.

Există în fascioloza hepatică 2 faze. Prima fază, în care intră trecerea prin parenchimul hepatic, durează 2—3 luni. Viermii în creștere nu sînt încă în stare de a depune ouă. Deci examenul coproparazitologic va fi negativ, în ciuda unor simptome foarte serioase ale îmbolnăvirii de natură toxicoalergică : eozinofilia foarte ridicată, dureri hepatice, dureri articulare, urticarie, febră.

În cea de a doua fază, parazitul se găsește în canalele biliare : fenomenele clinice se atenuează considerabil. Parazitul poate trăi



Scanned with OKEN Scanner

în canalele biliare un mare număr de ani, în care timp apar din cînd în cînd fenomene de angiocolită, retenţie biliară, colici hepatice. Dar între timp ficatul e cuprins tot mai mult de ciroză, care se dezvoltă în jurul canalelor biliare parazitate.

Oul de *Fasciola hepatica* are o formă ovalară şi o mărime de 140 pe 80 de microni. La unul din poli prezintă un căpăcel. Seamănă deci cu oul de botriocefal, faţă de care însă e cu mult mai mare. O altă deosebire faţă de oul de botriocefal o constituie subţirimea cojii externe, care la *Fasciola hepatica* se deformează cu uşurinţă. Se pot găsi ouă foarte alungite, altele romboidale, altele cu suprafaţa brăzdată de cute. Pe de altă parte capacul, comparat ca mărime cu mărimea totală a oului, e mai mic la *Fasciola* ca la botriocefal.

*Ouă de trecere.* Persoanele care mănîncă ficat de vită parazitat cu *Fasciola hepatica* pot elimina cu materiile fecale ouăle acestui parazit — ouă care sînt numai „în trecere" prin intestinul lor. De aceea, în cazurile în care la analiza coproparazitologică se găsesc ouă de *Fasciola hepatica,* înainte de a trage concluzia că individul respectiv suferă de fascioloză, este necesar să se repete analiza după un regim lactat de cîteva zile — deci după excluderea oricărei posibilităţi de proveniență a ouălor „din afară".

În general omul are un parazitism redus şi numărul de ouă eliminate de puţinii paraziţi prezenţi este, de asemenea, redus. Pe de altă parte, ouăle de *Fasciola hepatica* sînt foarte grele şi nu se ridică la metodele de flotaţie cu clorură de sodiu. De aceea, cînd bănuim o fascioloză hepatică este bine să procedăm al un tubaj duodenal şi să căutăm ouăle în bila B prin simpla centrifugare a bilei. Vom avea astfel mai multe şanse de a pune în evidenţă puţinele ouă existente.

**Dicrocoelium lanceolatum** (sin. **D. dendriticum**). Este un distomian hepatic cu mult mai mic. Măsoară 8—12 mm, pe o lăţime de 1,5—2,5 mm. Forma corpului, spre deosebire de *Fasciola,* e mai atenuată în partea anterioară (de aci comparaţia cu un fier de lance). Cuticula care îl îmbracă e transparentă şi lasă să se vadă foarte bine întreaga organizaţie.

Spre deosebire de *Fasciola hepatica,* evoluează prin melci terestri, ca *Helicella candidula* sau *Zebrina detrita.* Cercarii eliminaţi de aceşti melci se închistează pe fire de iarbă, de unde sînt ingeraţi de o furnică, în care se formează metacercarul infecţios. Animalele şi omul se infestează prin ingerarea acestei gazde intermediare.

Ouăle sînt caracteristice. Măsoară 40—45 de microni, pe 22—30 de microni. Nu sînt perfect ovoidale, ci plan-convexe şi foarte



Scanned with OKEN Scanner

intens colorate în brun. În interiorul lor se găseşte un embrion aproape complet dezvoltat.

Rolul patogen al acestui parazit la om e puţin studiat. Într-un caz observat la noi de Degan şi colab. existau fenomene care simulau maladia Hodgkin. Într-un caz observat de unul din noi la necropsie (moartea se datora altei cauze), ficatul era hipertrofiat şi vezicula biliară era aderentă de ficat printr-un proces fibros — mărturie a unei inflamaţii a colecistului. Mandoul şi colab. citează ca simptome ale dicroceliozei astenie severă, anorexie, debilitate generală şi subfebrilitate.

Şi pentru Dicrocoelium se pune aceeaşi problemă a ouălor „de trecere" şi a necesităţii căutării lor prin tubaj duodenal. Găsirea de ouă de Dicrocoelium în diverse stadii de dezvoltare — unele necolorate — este un argument pentru proveniența lor din afară, din uterul unui vierme adult ingerat odată cu alimentele şi dezintegrat în procesul de digestie.

Se întîlneşte la om relativ rar ca parazit adevărat, mult mai rar ca *Fasciola hepatica.*

**Opistorchis felineus.** Are aceeaşi formă, dar este cu foarte puţin mai mare decît *Dicrocoelium lanceolatum,* de care se deosebeşte şi prin unele caractere de organizaţie internă. Poate parazita nu numai în canalele biliare, dar şi în acelea pancreatice. Are o culoare roşiatică. În afară de om poate fi găsit la unele animale domestice şi sălbatice (cîine, pisică, vulpe, dihor şi altele). La om se găseşte cu oarecare frecvenţă în nord-estul Europei şi în vestul Siberiei (în special în valea rîului Obi). S-au citat cazuri şi în Ucraina. La noi în ţară au fost semnalate foarte puţine cazuri, în Dobrogea.

Ouăle sale sînt operculate, măsurînd 25—30 de microni, pe 10—15 microni. Capacul e mic, foarte convex şi introdus ca într-o ramă într-o îngroşare circulară a polului anterior. La polul posterior prezintă un pinten ascuţit. Sînt embrionate la depunere. Evoluează prin melci acvatici, ca o primă gazdă intermediară. Cercarii ieşiţi din melci se închistează la a 2-a gazdă intermediară, care e un peşte. Profesorul Ciurea a arătat că următorii peşti de la noi pot fi gazda intermediară pentru acest distomian : linul, văduviţa, roşioara, plătica, mreana şi crapul.

Rolul patogen e în funcţie de numărul viermilor prezenţi. Acest număr poate fi în unele cazuri — în special în regiunea siberiană — foarte ridicat, de cîteva mii de exemplare. În jurul numeroaselor ouă îngrămădite în vezica biliară se pot forma calculi. Se poate produce ciroză hepatică şi ascită şi chiar o cancerizare a ficatului sau pancreasului.



Scanned with OKEN Scanner

**Clonorchis sinensis.** Seamănă ca formă cu specia de mai sus, pe care însă o poate întrece în mărime. Au fost semnalate exemplare ajungînd în lungime la 25 microni şi în lăţime la 5 microni. Oul măsoară 27—35 microni pe 12—20 microni. În medie 29 microni pe 16 microni (Faust). Forma lor e asemănătoare cu aceea a ouălor

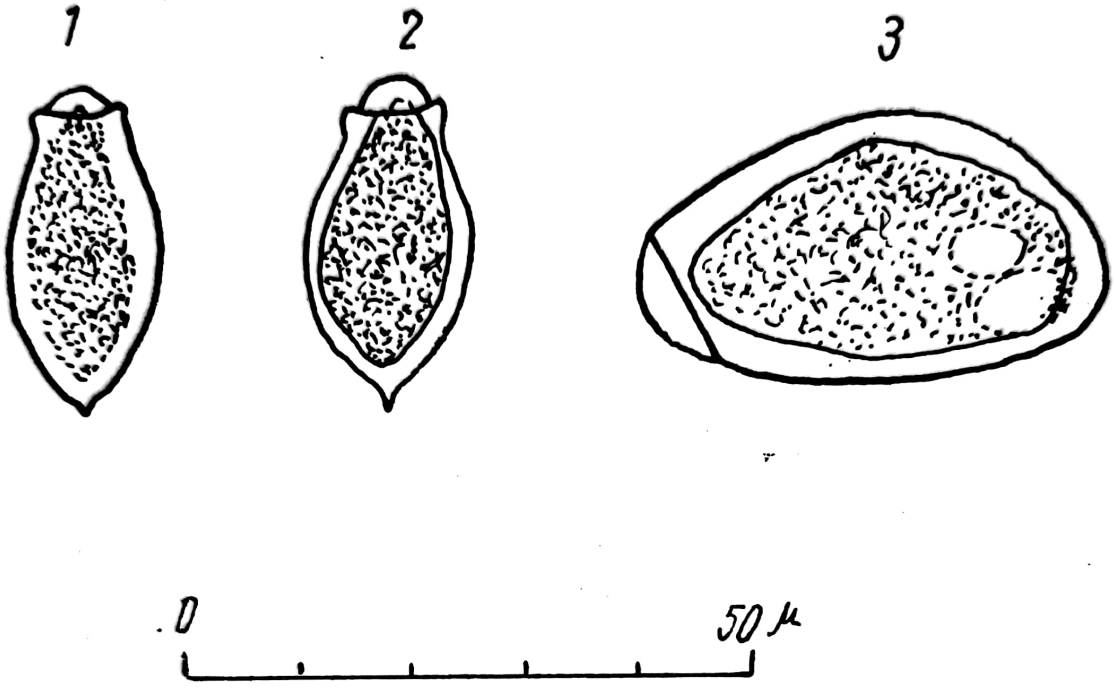



*Fig. 68.* — 1 — ou de *Opistorchis felineus*; 2 — ou de *Clonorchis sinensis*; 3 — ou de *Dicrocelium lanceolatum.*

de *Opistorchis felineus.* Prezintă şi ele un pinten mic la polul posterior. Este embrionat în momentul depunerii.

*Clonorchis sinensis* nu se găseşte la noi ca parazit autohton. E foarte frecvent în Extremul-Orient : China, Japonia, Indochina. Clonorhoza hepatică poate fi foarte gravă. Poate produce caşexie, ascită, precum şi metaplazia epiteliului căilor biliare şi cancer hepatic. După Phillipson, ouăle de Opistorchis şi de Clonorchis se urcă foarte bine în soluţia saturată de sulfat de magneziu.

### *Distomatoze intestinale*

Distomienii, cu habitat intestinal, sînt toţi paraziţi exotici. Ne vom ocupa în rîndurile de mai jos de 3 specii, şi anume : *Fasciolopsis buski, Heterophies heterophies, Echinostomum ilocanum.*



Scanned with OKEN Scanner

**Fasciolopsis buski.** Viermele trăieşte în intestinul subţire. Poate ajunge în duoden şi chiar în stomac. Seamănă oarecum cu *Fasciola hepatica,* dar e mai alungit, măsurînd 5—7 cm, pe o lăţime de 1,5—2 cm. Tubul său digestiv e divizat în 2 ramuri principale, care nu mai sînt ramificate secundar. Produce tulburări digestive, duodenită, diaree cronică. Tulburările sînt în raport cu numărul viermilor prezenţi, deci cu intensitatea infestaţiei. Cînd viermii sînt foarte numeroşi pot apărea şi fenomene de subocluzie sau chiar ocluzie intestinală.

*Fasciolopsis buski* devine adult la 3 luni după infestare. Deci şi în cazul acestui parazit există o perioadă negativă, destul de lungă, în care nu pot fi găsite ouăle sale.

Ouăle sînt ovoidale şi operculate ; măsoară 125 de microni pe 75 de microni. Nu sînt embrionate în momentul depunerii. Conţin, ca şi cele de *Fasciola hepatica,* numeroase celule viteline.

Evoluează prin moluşte de apă. Cercarii produşi se închistează pe anumite vegetale acvatice, ca *Trapa natans, Eliocharis tuberosa* şi altele. Prin decorticarea acestora cu dinţii se produce infestarea umană.

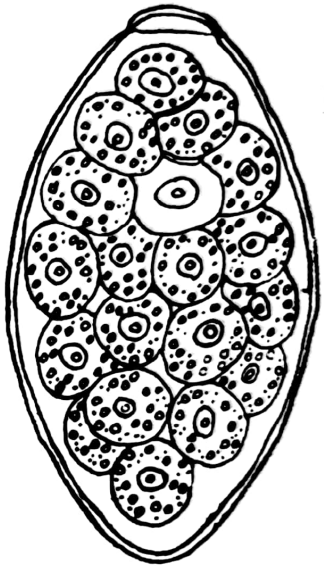


*Fig. 69.* — Ou de *Fasciolopsis buski* (după Looss, în Braun-Seifert).

**Heterophies heterophies.** Se găseşte în Egipt, în Orientul Mijlociu şi în Extremul Orient. E un trematod foarte mic, de culoare roşiatică, măsurînd 2 mm lungime, pe 0,4—0,5 mm lăţime. Are extremitatea anterioară atenuată, iar cea posterioară foarte lărgită. În afară de om poate parazita şi în intestinul unor animale domestice (cîine, pisică) sau sălbatice (vulpe).

Ouăle sale, de culoare brună-deschis, au o coajă groasă şi măsoară 26—28 de microni pe 15—17 microni. Sînt ovoidale şi posedă un căpăcel relativ mare. La polul opus prezintă un foarte mic pinten. După E. Brumpt şi Neven-Lemaire ele nu sînt complet embrionate în momentul depunerii. După E. C. Faust, însă, sînt complet embrionate.

Parazitul produce tulburări intestinale care se pot complica cu tulburări cardiace sau cerebrale, datorită faptului că parazitul poate produce leziuni ale mucoasei intestinale, care favorizează trecerea în circulaţie a unora din ouă, ce ajung pe această cale în creier sau în miocard.



Scanned with OKEN Scanner

**Echinostomum ilocanum.** Se întîlneşte în Extremul Orient. E un parazit intestinal de culoare roşcată, care poate ajunge la o lungime de 6,5 mm, pe o lăţime de 1,30 mm şi o grosime de 0,5—0,6 mm. Este atenuat posterior. În jurul orificiului bucal posedă numeroşi spini.

Ouăle sale, gălbui, sînt ovalare şi opercutate. Căpăcelul e relativ mare. Ele măsoară 85—115 microni, pe 60—70 de microni. Nu sînt embrionate la depunere.

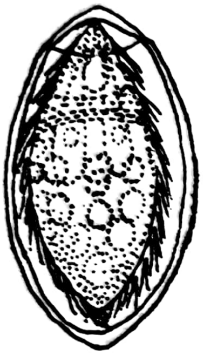


Fig. 70

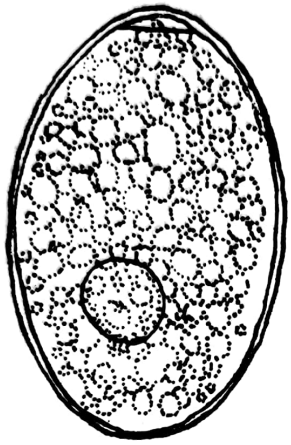


Fig. 71

*Fig. 70.* — Ou de *Heterophies heterophies* (după E. C. Faust).

*Fig. 71.* — Ou de *Echinostomum ilocanum* (după Tubangui şi Pascu, în Faust şi Russel).

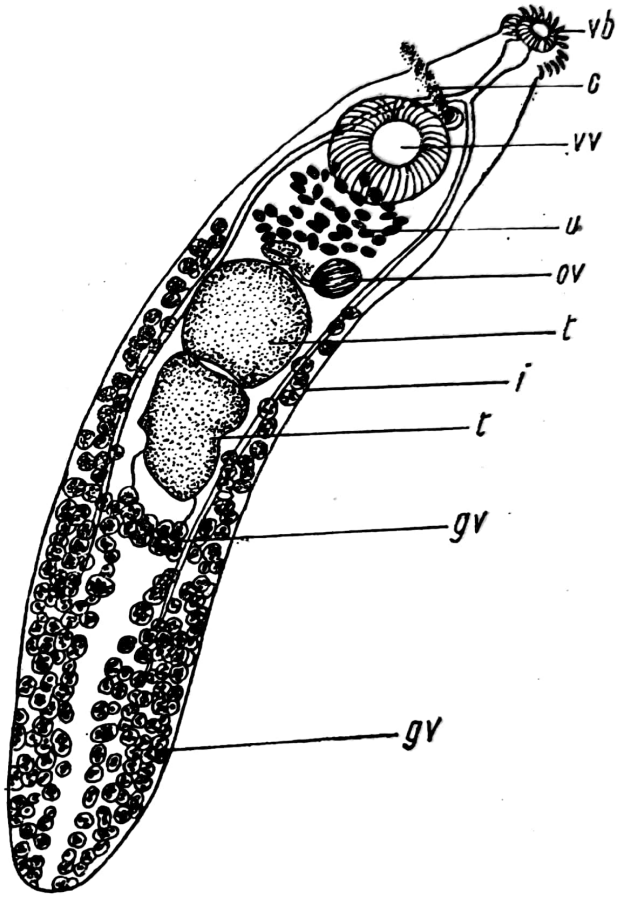



Fig. 72

*Fig. 72.* — *Euparyphium jassyense* (viermele adult). *vb* — ventuza bucală; *vv* — ventuza ventrală; *i* — intestinul; *t* — testicule; *ov* — ovarul; *gv* — glandele vitelogene; *u* — uterul cu ouă; *c* — cirul.

Evoluează prin melci de apă. Cercarii din prima gazdă intermediară se închistează în o a doua gazdă intermediară, care e tot un melc de apă, ca *Pila conica* sau *Viviparus javanicus*. Infestarea se face prin consumarea acestor melci cruzi de către populaţia indigenă.

La noi în ţară N. Leon a găsit la un individ de origine persană cîteva exemplare ale unui trematod intestinal pe care le-a identificat întîi ca aparţinînd speciei *Echinostomum ilocanum*. Studiindu-le ulterior, împreună cu I. Ciurea, le-a determinat ca reprezentînd o specie nouă a genului *Euparyphium*, specie pe care a denumit-o *Euparyphium jassyense* (fig. 72).



Scanned with OKEN Scanner

**Paragonimus ringeri** (poate sinonim cu P. westermani). Se găseşte în Extremul-Orient la om şi la un mare număr de animale (tigru, panteră, lup, vulpe, cîine, pisică, porc). Este un distomian scurt şi gros. Are o faţă ventrală plată şi una dorsală convexă, ceea ce l-a făcut să fie comparat ca formă cu un bob

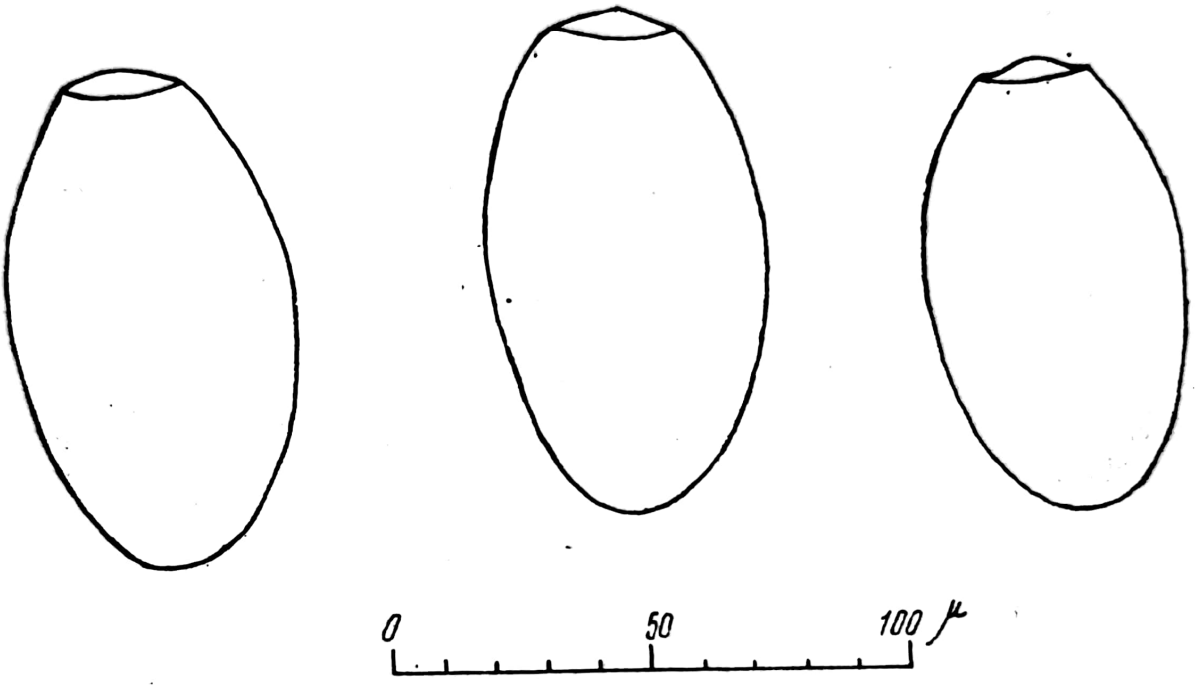



*Fig. 73.* — Ouă de *Paragonimus ringeri.*

de cafea. Poate ajunge la 1,5 cm în lungime, pe 7—8 mm lăţime şi 4—5 mm grosime. Parazitează în plămîni.

Paraziţii trăiesc cîte 2 în chisturi cu pereţi fibroşi, formaţi pe socoteala bronhiilor. În general în chisturi se găseşte un lichid gros, de culoare cărămizie, în care plutesc numeroase ouă eliminate de viermi. Din cînd în cînd chisturile se rup şi lasă să se scurgă ouăle, care se elimină prin spută. Atunci cînd sputa e înghiţită, ceea ce se întîmplă de regulă la animale şi, de multe ori, şi la om, ouăle trec în tubul digestiv şi sînt eliminate cu materiile fecale.

Ouăle au o formă ovoidală, măsurînd 85—100 de microni, pe 50—60 de microni. La unul din poli prezintă un capac mare, turtit. Nu sînt embrionate în momentul eliminării.

Evoluează prin unii melci de apă (Melania libertina) — ca o primă gazdă intermediară. Cercarii se închistează la o a doua



Scanned with OKEN Scanner

gazdă intermediară, care e fie un crab, ca *Potamon dehaani*, fie un rac (cum e *Astacus japonicus*). Prin consumarea crudă sau puţin modificată termic a acestei a doua gazde se produce infestarea.

Boala pulmonară produsă e cronică, de lungă durată. Se poate complica prin pătrundere de ouă intrate prin torentul circulator în creier sau în alte organe şi are, de multe ori, un sfîrşit letal.

### *Distomatoze sanguicole (Schistosomiazele)*

Ne vom referi la următoarele 4 specii : *Schistosoma mansoni, Schistosoma japonicum, Schistosoma intercalatum, Schistosoma haematobium*, ale căror ouă pot fi întîlnite la examenele coproparazitologice.

Schistosomidele (sin. : bilharţii) sînt trematode care posedă caractere morfologice şi biologice particulare — dintre care cel mai important e faptul de a avea sexe separate. Cele două sexe trăiesc alăturate, femela fiind înconjurată ca de o albie (canalul ginecofor) de marginile laterale ale masculului. Paraziţii trăiesc în sînge, în vene, în particular în ramurile venei porte, unde se face acuplarea. Pentru a-şi depune ouăle femela, împreună cu masculul, migrează în capilarele organelor care sînt în comunicare cu exteriorul şi care sînt vezica urinară (pentru *Schistosoma haematobium*) şi intestinul gros (pentru *Schistosoma mansoni* şi *Schistosoma intercalatum*). *Schistosoma japonicum* îşi depune ouăle în capilarele celor mai diferite organe, dar numai acelea depuse în pereţii unui organ în comunicaţie cu exteriorul îşi vor putea continua evoluţia. Celelalte sînt sortite pieirii. Putem deci găsi în materiile fecale şi ouăle acestui parazit.

În momentul depunerii de către parazit ouăle nu sînt încă embrionate şi sînt mai mici. Ele cresc mult atunci cînd embrionul se formează în ele şi cînd ajung a fi eliminate din corpul gazdei, prin urină sau materii fecale. Dăm mai jos forma şi dimensiunile acestor ouă, aşa cum le găsim la examenele coproparazitologice. Aceste dimensiuni sînt variate în raport cu condiţiile de dezvoltare a paraziţilor la diverse gazde şi cu cazurile în care au fost consemnate de diferiţi autori. Cifrele pe care le dăm mai jos sînt acelea prezentate de Faust şi Russel.

**Schistosoma mansoni.** Ou ovalar, mare, fără căpăcel. Măsoară 114—175 pe 45—68 de microni. Posedă un mare pinten (20 de microni) lateral, ascuţit. Sînt embrionate.



Scanned with OKEN Scanner

**Schistosoma japonicum.** Ouă ovalare, mult mai mici. Măsoară 70—100 pe 50—65 de microni. Sînt lipsite de opercul. Lateral prezintă un pinten mic, teşit, uneori greu vizibil. Sînt embrionate.

**Schistosoma intercalatum.** Ou mare, ovalar, fără opercul. Măsoară 140—240 pe 50—85 de microni. Posedă un pinten mare şi ascuţit la unul din poli. Prin aceasta ele seamănă cu ouăle de *Schistosoma haematobium*, care însă se elimină de regulă prin

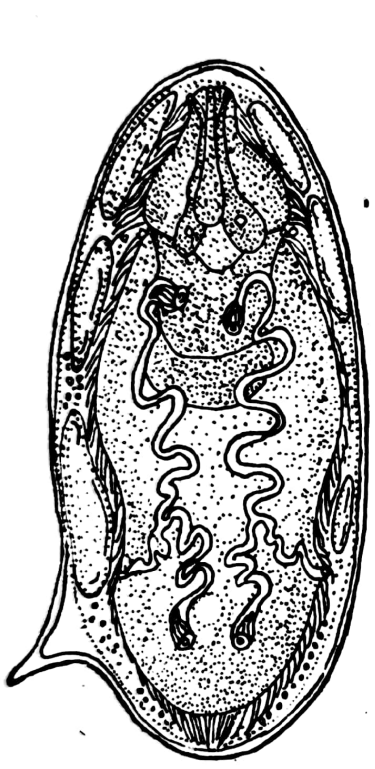


Fig. 74

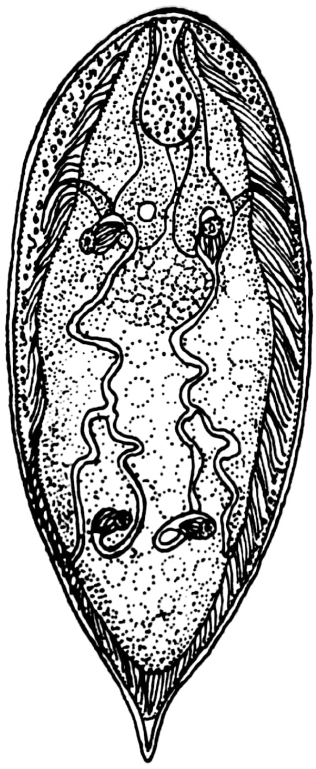


Fig. 75

Fig. 76

*Fig. 74.* — Ou de *Schistosoma mansoni* (după E. C. Faust).

*Fig. 75.* — Ou de *Schistosoma haematobium* (după E. C. Faust).

*Fig. 76.* — Ou de *Schistosoma japonicum* (după E. C. Faust).

pereţii vezicii urinare şi deci prin urină. Totuşi, excepţional, se găsesc uneori şi în materiile fecale ouă de *S. haematobium*, eliminate prin capilarele intestinale, şi trebuie să ştim să le deosebim.

Ouăle de *S. haematobium* sînt în general mai mici. Măsoară 112—170 pe 40—70 de microni. Sînt la fel embrionate. Dar în schistosomiaza vezicală bolnavul va prezenta în acelaşi timp aceleaşi ouă şi în urină — şi în cantitate mai mare.

Depunerea ouălor în capilarele pereţilor vezicii şi ai tubului digestiv se întovărăşeşte de o reacţie inflamatoare şi hiperplazică,



Scanned with OKEN Scanner

care duce la formarea de polipi şi de ulceraţii sîngerînde. Cîteodată, cînd ouăle se găsesc cu greutate la examenul coproparazitologic prin metodele obişnuite, se poate utiliza, pentru punerea lor în evidenţă, metoda biopsiei rectale sau a raclajului mucoasei rectale.

Biopsia rectală se face asupra valvulei rectale inferioare, cu o pensetă specială, cu care se culege o mică parcelă de mucoasă şi submucoasă. Fragmentul obţinut se spală întîi cu apă şi se presează apoi între două lame lipite strîns una de alta cu o panglică adezivă.

J. A. Turner (1962) preconizează raclajul rectal pe aceeaşi regiune. Raclajul se face cu o chiuretă cu coadă lungă, în cursul rectoscopiei. Produsul obţinut se examinează între lamă şi lamelă — după ce lamela a fost apăsată pentru a subţia preparaţia şi a-i mări transparenţa. Raclajul evită sîngerarea şi utilizează un aparataj mai ieftin. Pentru buna reuşită a operaţiei este necesar ca la pregătirea bolnavului pentru rectoscopie să se introducă un supozitor cu 10 mg biscodyl, graţie căruia se produce un scaun care evacuează rectul şi colonul sigmoid, fără a se îndepărta mucusul care ar fi fost spălat şi îndepărtat prin clismele obişnuite (I. A. Turner).

### Nematode (viermii cilindrici)

Ne vom referi mai jos la următoarele specii aparţinînd *Nematodelor : Ascaris lumbricoides, Trichuris trichiura, Enterobius vermicularis, Ankylostoma duodenale, Necator americanus, Strongyloides stercoralis.*

**Ascaris lumbricoides.** Este limbricul, a cărui înfăţişare este prea bine cunoscută, pentru a mai fi necesară o descriere. O vom face doar în cîteva cuvinte, pentru a ne conforma planului general al lucrării de faţă.

La nematode sexele sînt separate. Vor exista deci ascarizi femeli şi ascarizi masculi.

Ascaridul femel măsoară 20—30 cm, pe o grosime de 5—7 mm. E un vierme alb-gălbui, uneori roz, cilindric, cu ambele extremităţi atenuate şi drepte. Cea anterioară, la capătul căreia se află orificiul bucal, este mai ascuţită decît cea posterioară, care se termină obtuz.

Ascaridul mascul e mai scurt şi mai subţire. Măsoară 12—17 cm, pe abia 3—4 mm grosime. Şi el are ambele extremităţi la fel atenuate, dar extremitatea posterioară este răsucită într-o cîrjă foarte caracteristică.



Scanned with OKEN Scanner

Ascarizii parazitează în intestinul subţire. Uneori se elimină spontan pe gură sau prin anus şi sînt aduşi de bolnav pentru identificare.

Femela produce numeroase ouă. Ele sînt ovoidale. Au o culoare galben-brună, datorită materiilor fecale. Măsoară 70—75 de microni pe 40—60 de microni. Posedă o coajă groasă, alcătuită din

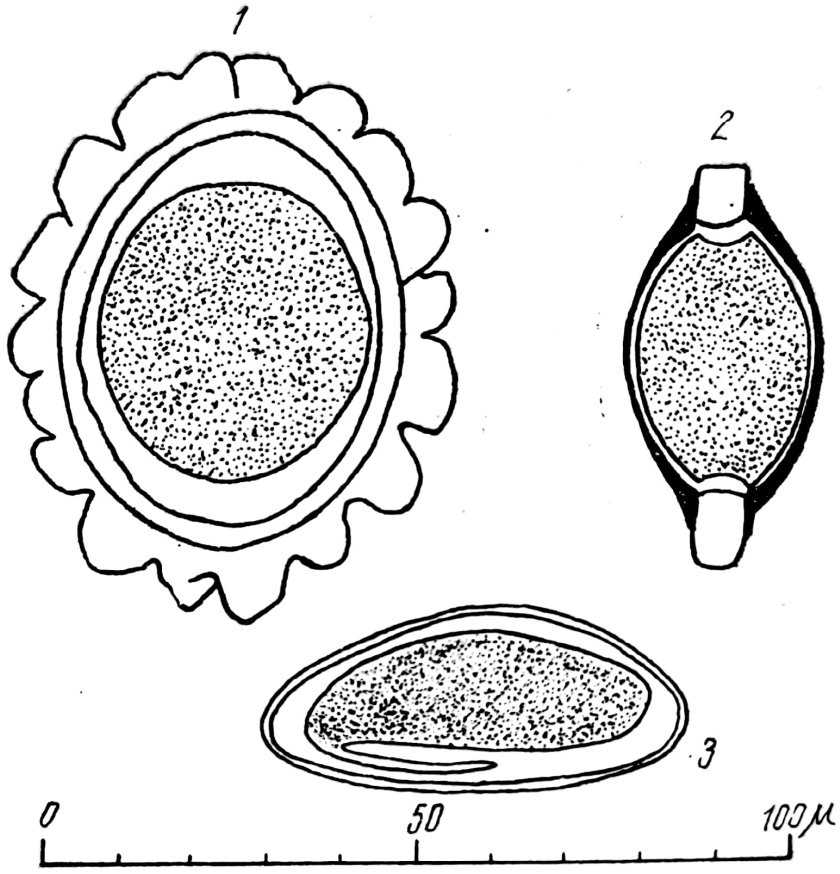



*Fig. 77.* — Ouă de nematode. 1 — ou de ascaris ; 2 — ou de trichocefal ; 3 — ou de oxiur.

straturi concentrice suprapuse. Aceasta e învelită de o pătură externă albuminoasă, pe care se ridică numeroase mameloane caracteristice, pe baza cărora nimic nu e mai uşor de recunoscut decît acest ou. Uneori însă pătura albuminoasă mamelonată poate lipsi, sub influenţa unor metode de analiză necorespunzătoare. Atunci oul trebuie recunoscut după formă, mărime şi conţinut, chiar în lipsa ei. În interior se găseşte o singură celulă nesegmentată, de formă aproape sferică, aşa că între ea şi extremităţile spaţiului ovoid rămîne un spaţiu liber, iarăşi caracteristic (fig. 77).



Scanned with OKEN Scanner

Se întîmplă uneori ca bolnavul să posede ascarizi numai de sexul feminin. Aceştia vor depune ouă nefecundate. Ele sînt ceva mai alungite, putînd ajunge la 80 de microni, au uneori o formă neregulată, capricioasă, datorită cojii lor mai subţiri ; au o membrană albuminoasă mamelonată foarte dezvoltată, iar conţinutul protoplasmatic umple în întregime spaţiul delimitat de coaja oului. Ele sînt şi mai grele şi apar rareori la flotaţia cu clorură de sodiu saturată. Această soluţie trebuie înlocuită cu o soluţie salină mai densă, cum e soluţia saturată de azotat de sodiu.

Ouăle fecundate de ascarizi îşi vor continua dezvoltarea în mediul extern — mai repede sau mai încet — în raport cu temperatura, umezeala şi oxigenarea mediului. În condiţii foarte prielnice se poate forma în interiorul lor o larvă mobilă, chiar după 2 săptămîni. Această larvă nu e încă infecţioasă. Ea năpîrleşte chiar în interiorul oului şi se transformă în larvă de gradul 2, care e infestantă.

Ingerată cu apa sau cu alimentele, această larvă iese din ou în cavitatea intestinală, trece prin peretele intestinal şi pătrunde prin circulaţia portală în ficat. După vreo 4 zile ea trece pe calea venelor suprahepatice în cord, apoi în artera pulmonară şi în circulaţia pulmonară şi mai apoi în interiorul micilor bronşiole. După cca. 6 zile, în care timp poate cauza fenomene de pneumonie vierminoasă, se urcă pe căile respiratorii, ajunge în laringe, în faringe şi, prin calea esofagiană, se reîntoarce în intestin, după ce a realizat ceea ce se cheamă un ciclu „perienteric“ sau „parenteral“, ciclu care durează cca. 10 zile. Revenită în intestin, larva năpîrleşte de mai multe ori, creşte, devine ascarid adult — masculul sau femel. Femela începe să producă şi să depună ouă, dar nu înainte de 2 1/2 luni de la infestare. Există aşadar o lungă perioadă în care nu vom găsi ouă de ascarizi la examenele coproparazitologice şi atunci diagnosticul tulburărilor clinice provocate trebuie pus pe alte baze (reacţii imunobiologice). În cursul ciclului perienteric nu rareori se pot găsi larve de ascarid în spută. Ele măsoară cca. 1 mm în lungime.

**Trichuris trichiura (tricocefalul).** Este un vierme cilindric, mult mai mic. Masculul măsoară 3,5—4,5 cm, pe o grosime maximă de 1 mm. Femela poate ajunge la 5 cm. Caracterul morfologic cel mai izbitor al tricocefalului este de a avea corpul constituit din 2 porţiuni de grosimi net deosebite : porţiunea posterioară este cu mult mai groasă decît cea anterioară. La mascul porţiunea anterioară subţire se raportează la lungimea porţiunii posterioare mai groase, ca 3 la 2, iar la femelă, ca 4 la 2, deci este relativ mai lungă decît la mascul şi reprezintă 2/3 din lungimea totală a viermelui. Aces-



Scanned with OKEN Scanner

tei diferenţe de grosime între cele 2 porţiuni ale parazitului i se datoreşte şi numele, „tricocefal“ vrînd să spună „cu capul ca un fir de păr“, înţelegînd prin cap întreaga porţiune anterioară, la sfîrşitul căreia se află orificiul bucal. Pentru a denumi figurat această formă particulară germanii şi anglo-saxonii îl numesc „viermele bici“ *(Peitschenwurm, whipworm)*, comparîndu-se porţiunea îngroşată a viermelui cu mînerul, iar porţiunea subţiată, cu sfîrcul biciului.

Ca şi la ascarid, extremitatea posterioară a femelei se termină în axul corpului, pe cînd aceea a masculului se întoarce în cîrjă, dar răsucirea cîrjei se face la tricocefal pe faţa dorsală, pe cînd la ascarid — pe faţa ventrală a viermelui.

Tricocefalul trăieşte în cecum şi în restul intestinului gros. Se hrăneşte cu chim intestinal, dar şi cu sînge, pe care-l culege din grosimea mucoasei.

Ouăle tricocefalului sînt tot aşa de deosebite faţă de celelalte ouă de helminţi, pe cît de deosebită e forma sa faţă de forma celorlalţi helminţi. Ele sînt ovoidale, cu două proeminenţe polare care le dă o înfăţişare de lămîie. Măsoară 50—55 pe 22—25 de microni. Coaja oului e foarte groasă şi brună. Proeminenţele polare sînt albuminoase şi apar ca nişte dopuri care înfundă orificiile circulare de la extremităţile polare ale cojii chitinoase. Aceste proeminenţe reprezintă punctele de rezistenţă mai slabă a oului. Cînd larva care se formează în ou părăseşte oul, o face ca o consecinţă a distrugerii acestor dopuri albuminoase (2 — fig. 77).

Oul, cînd e depus de femelă nu conţine decît o singură celulă. Diviziunea ei şi formarea larvei infestate au loc în mediul extern, într-un timp ceva mai lung decît acela necesitat de ouăle de ascarid, timp în raport cu căldura, umezeala şi oxigenarea. Ele au nevoie de un grad de umezeală mai ridicat decît acela necesitat de ouăle de ascarizi.

Se pot găsi uneori ouă de tricocefal mari, măsurînd 70—80 pe 37—40 de microni, mărime corespunzătoare ouălor de *Trichuris vulpis* (L. S. Neumann), tricocefal parazit la cîine. Cazurile cu asemenea ouă trebuie urmărite, pentru a se elucida dacă e vorba de ouă „în trecere“ de tricocefal de cîine (caz în care ele nu au şansa de a mai apărea la controalele ulterioare) sau e vorba de o adaptare fortuită, dar posibilă, a acestui parazit al cîinelui la om.

**Enterobius vermicularis** (oxiurul). Este un nematod foarte mic. Masculul are 3—5 mm lungime, pe o grosime de 1/5 mm, iar femela măsoară cca 1 cm, pe o grosime de 1/2 mm. Extremitatea posterioară a masculului e întoarsă în cîrjă pe faţa ventrală. Extremitatea posterioară a femelei e dreaptă şi foarte ascuţită (de aici



Scanned with OKEN Scanner

îi vine şi numele, cuvîntul oxiur însemnînd „coadă ascuţită“). Poporul numeşte aceşti viermi cu numele simplu de „viermişori“.

Oxiurii trăiesc în cecum, unde se acuplează. Femela formează numeroase ouă în uterele sale (posedă 2 trunchiuri uterine), dar, spre deosebire de alţi nematozi, nu depune ouăle unul cîte unul, pe măsura formării lor, ci le păstrează pe toate pînă ce oul se segmentează şi se formează în interiorul său o larvă denumită „larvă giriniformă“, care are forma unui mormoloc de broască, posedînd un corp relativ gros, căruia îi urmează o porţiune subţire, ca o coadă, care e repliată sub porţiunea îngroşată.

Cu acest pachet de ouă embrionate femela se deplasează spre orificiul anal, forţează acest orificiu şi depune deodată în afară, toate ouăle, în cutele orificiului anal sau în regiunea perianală. Dacă vrem să găsim ouă de oxiuri, trebuie să le căutăm aici, prin metodele expuse mai sus (pag. 70), şi nu în materiile fecale. Totuşi uneori se pot găsi şi în materiile fecale ouă de oxiuri, în special atunci cînd parazitarea este intensă. Sînt ouă foarte uşoare, care se ridică repede la suprafaţa soluţiilor saturate de clorură de sodiu.

Oul de oxiur măsoară 50—60 pe 20—25 de microni, sînt ovoide dar asimetrice — plan-convexe. Au două învelişuri foarte subţiri, alăturate între ele, care permit să se vadă cu uşurinţă larva formată în ou. Larva giriniformă se transformă repede, după ce oul a ajuns la exterior, în larvă vermiformă, infestantă.

Ouăle fiind embrionate şi posedînd o larvă infestantă sînt infecţioase. Ele pot provoca fenomenul de autoinfestare, care perpetuează infestarea la purtătorii de oxiuri (3 — fig. 77).

Migrînd în jurul orificiului anal, oxiurii pot pătrunde la femei şi fetiţe în vulvă şi vagin şi pot depune ouă şi în aceste organe. În acelaşi timp ele aduc dinafară microorganisme care vor provoca o vulvovaginită. De cele mai multe ori vulvovaginita fetiţelor mici este o consecinţă a oxiuriazei.

La copii ouăle pot fi căutate şi în negrul de sub unghie. Se ţin mai întîi degetele într-o soluţie diluată de hidroxid de sodiu (leşie) şi se raclează cu vîrful unui bisturiu negrul de sub unghie. Ouăle ajung aici ca o consecinţă a scărpinatului conştient şi inconştient în regiunea perianală, scărpinat provocat de mîncărimile intense produse de mişcările oxiurilor în această regiune. Un alt loc în care avem putinţa de a găsi la copii ouăle de oxiuri e în mucozităţile nazale — avînd în vedere faptul că mulţi copii obişnuiesc să-şi introducă degetele în nas.

**Ankylostoma duodenale.** Este un vierme cilindric (nematod) alb-rozatru. Masculul măsoară 8—12 mm. Extremitatea lui anterioară se termină cu o capsulă bucală, chitinoasă, înarmată cu



Scanned with OKEN Scanner

cîrlige ascuţite, iar extremitatea posterioară, cu un fel de clopot membranos, denumit *punga copulatoare*. Clopotul e ţinut deschis de către nişte coaste de întărire, asemănătoare cu spiţele unei umbrele. Femela e mai lungă. Măsoară 10—18 mm şi posedă la fel, anterior, o capsulă bucală înarmată cu cîrlige ascuţite. Posterior este atenuată şi se termină cu un mic spin.

Ouăle sînt ovoidale, posedă un înveliş foarte subţire şi măsoară 60 pe 40 de microni (fig. 78). Celula-ou este divizată în 4 blastomere (şi chiar mai multe uneori), care se văd cu uşurinţă prin transparenţa învelişului. Diviziunea oului se continuă cu repeziciune după eliminarea în mediul extern. În 24 de ore larva este formată şi eclozează. Este o larvă rabditoidă, adică posedînd 2 dilataţii esofagiene, din care cea de a 2-a este sferică şi prevăzută înăuntru cu 3 dinţi chitinoşi.

Larva rabditoidă năpîrleşte pe sol şi dă naştere unei larve strongiloide, adică posedînd o singură dilataţie esofagiană. Larva strongiloidă, la rîndul ei năpîrleşte, dar rămîne învelită în cămaşa (exuvia) de năpîrlire. Devine prin aceasta „larvă închistată" (în propria ei cămaşă de năpîrlire). Este foarte mobilă şi capabilă de a pătrunde prin piele, după ce îşi leapădă cămaşa, realizînd infestarea pe această cale. La punctul de intrare în piele se formează, prin mecanism toxicoalergic şi infecţios, o iritaţie eczematiformă foarte pruriginoasă.

În ţările cu clima temperată *Ankylostoma duodenale* nu are condiţii bune de dezvoltare la suprafaţa solului, unde trebuie să se desfăşoare faza de existenţă liberă a parazitului. Dezvoltarea se face pe solul minelor de cărbuni, unde găseşte căldura şi umezeala necesare. Este de aceea un parazit al minierilor, cărora le provoacă o anemie foarte intensă (anemia minierilor). Parazitul a existat şi în ţara noastră, în minele de la Anina-Steindorf, dar a fost eradicat, graţie acţiunilor întreprinse de Ministerul Sănătăţii şi Ministerul Minelor. Azi la noi nu mai găsim ankilostomiază decît la persoanele care vin cu această infestare din ţări tropicale şi din Extremul Orient.

Analiza coproparazitologică în cazul ankilostomiazei trebuie făcută imediat după depunerea materiilor fecale. În materii fecale care au fost ţinute în laborator peste 24 de ore larvele din ouă eclozează, şi în loc de ouă, vom găsi larve rabditoide — pe care nu trebuie să le confundăm cu larvele de *Strongyloides stercoralis*, vierme despre care vom vorbi mai jos.

**Necator americanus.** Se deosebeşte de *Ankylostoma duodenale* prin cîteva caractere morfologice. E mai subţire şi mai scurt. Capsula bucală prezintă nişte lame tăioase, în loc de cîrlige. Coas-



Scanned with OKEN Scanner

tele de întărire ale pungii copulatoare a masculului sînt dispuse deosebit şi caracteristic. Femela nu mai posedă spinul terminal. Orificiul genital al femelei este situat în jumătatea anterioară a corpului, în loc să fie situat în jumătatea posterioară.

Ouăle de *Necator americanus* se deosebesc de acelea de *Ankylostoma duodenale* prin faptul că sînt ceva mai alungite ; măsoară 70 pe 40 microni (fig. 78). Ele au un număr mai ridicat de blas-

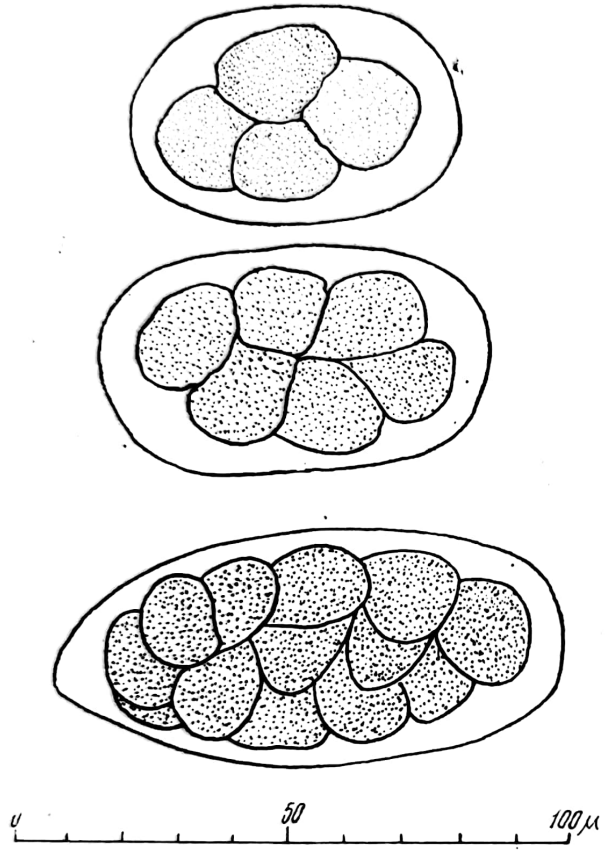



*Fig. 78.* — Ouă de nematode de tip ankilostoma. Sus — ou de *Ankylostoma duodenale.* La mijloc — ou de *Necator americanus.* Jos — ou de *Trichostrongylus sp.*

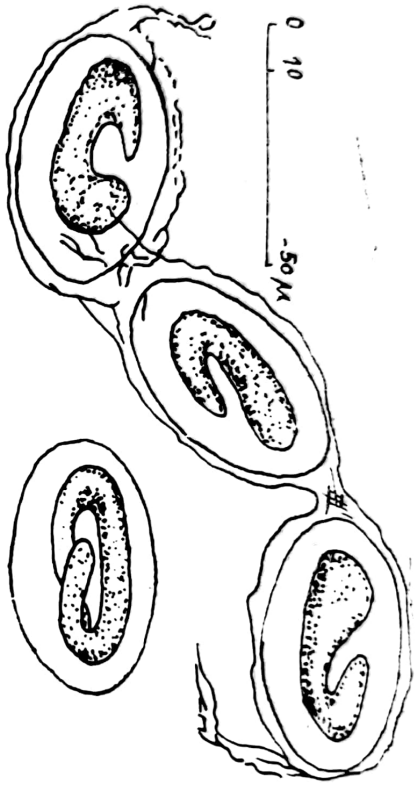



*Fig. 79.* — Ouă de *Strongyloides stercoralis* (după M. Langeron şi M. Rondeau du Noyer).

tomere. Ţinînd însă seama de numeroasele variaţii individuale, este foarte greu să identificăm viermele numai după înfăţişarea ouălor. De aceea în regiunile unde se găsesc ambii viermi vom nota pe buletin ouă de ankylostomide, fără a preciza căreia din cele 2 genuri aparţin.

**Strongyloides stercoralis.** Este cel mai mic nematod parazit al omului. Trăieşte în porţiunea anterioară a intestinului subţire. Femela măsoară 2 mm lungime, pe o grosime de 40—50 mi-



Scanned with OKEN Scanner

croni (deci a 20-a parte dintr-un milimetru). Extremitatea anterioară se atenuează progresiv. Cea posterioară — şi ea atenuată — se termină în unghi obtuz. Tipul esofagian e strongiloid. A fost descris şi un mascul parazit (asupra existenţei căruia nu toţi autorii sînt de acord), dar e sigur că femela poate produce ouă şi partenogenetic, aşa încît prezenţa masculului nu este considerată ca necesară. Ouăle sînt ovalare. Ele au o mărime de 50—58 pe 30—34 microni. Sînt embrionate în momentul depunerii şi eclozează imediat. De aceea nu se găsesc decît extrem de rareori ouă la analizele coprologice. Totuşi, în cazurile de tranzit foarte accelerat, însoţit de descuamări ale mucoasei, ele se pot găsi uneori înşirate în mici lanţuri, de 2—4 ouă (fig. 79).

Ceea ce găsim în mod obişnuit sînt larvele eclozate, care măsoară 200—300 de microni (uneori chiar şi mai mult). Sînt foarte vioaie şi produc o iritaţie pronunţată asupra pereţilor intestinali. Au un esofag rabditoid şi o extremitate posterioară care se ascute brusc.

Parazitul are însă şi o existenţă liberă. Larvele rabditoide ajunse pe sol în condiţii favorabile de temperatură şi umezeală pot trăi ca viermi liberi. Ele pot să năpîrlească şi să se transforme în larve strongiloide, care au capacitatea de a pătrunde prin piele la o nouă gazdă şi a o infesta ; sau larvele rabditoide, în urma năpîrlirii, pot să se transforme în adulţi (masculi şi femele), care constituie o generaţie liberă — şi uneori mai multe asemenea generaţii care se succed. În această generaţie liberă femela nu măsoară decît 1 mm, iar masculul 700 microni. După împerechere produc ouă care măsoară 70 pe 45 de microni şi care pot sta la baza ciclului liber următor (masculi şi femele), pînă ce larvele rabditoide, ieşite din ouăle generaţiei libere, nu vor mai reface o generaţie adultă, ci se vor transforma în larve strongiloide infestante pe cale cutanată. Larva strongiloidă e foarte fină, alungită, posedă un esofag strongiloid lung, iar extremitatea ei posterioară prezintă una sau două crestături care-i dau înfăţişarea că s-ar termina cu 2—3 dinţi.

Generaţia liberă de *Strongyloides stercoralis* trăieşte pe sol. Nu vom întîlni deci formele ei în examenul coprologic trimis la analiză. Ceea ce găsim sînt de regulă, cum am spus şi mai sus, larvele rabditoide pe cale de a se elimina în mediul extern şi uneori larve strongiloide, atunci cînd se realizează fenomenul de autohiperinfestare. În acest fenomen unele larve rabditoide se transformă, pe cînd sînt încă în intestin, în larve strongiloide infestante, iar acestea din urmă vor pătrunde prin pereţii intestinali,



Scanned with OKEN Scanner

își vor face ciclul perienteric prin plămîni și vor reintra din nou în intestin, pentru a se transforma în femele adulte (autoinfestare endogenă), crescînd deci simțitor cantitatea de viermi adulți existentă. Unele din aceste larve strongiloide pot fi eliminate și găsite la examenul coprologic. Larve strongiloide putem găsi și în coproculturi și le vom recunoaște după esofagul lor alungit, cu o singură dilatație, și coada lor bi- sau trifidă.

E necesar să putem deosebi larvele rabditoide de *Strongyloides stercoralis* de larvele, tot rabditoide, de *Ankylostoma* sau *Necator*, pentru că, așa cum s-a spus mai sus, ambele aceste tipuri larvare se pot întîlni în materii fecale care au rămas în laborator 24 de ore. Larvele de *Strongyloides* sînt ceva mai scurte și mai subțiri ca cele de ankilostomide, au o cavitate bucală cu mult mai scurtă, iar terminarea lor posterioară este ascuțită mai brusc, pe cînd cele de ankilostomide au o terminație posterioară subțiată, iar cavitatea bucală mai alungită. Primordiul genital e mult mai dezvoltat la larva de *Strongyloides* decît la cea de *Ankylostoma* sau de *Necator* (fig. 80).

**Trichostrongylus sp.** Tricostrongilidele sînt paraziți ai animalelor domestice și sălbatice (oaie, capră, vite, iepure) și păsări. Trăiesc în intestinul subțire. Sînt foarte mici (nu depășesc 1 cm lungime) și foarte subțiri (numele *Trichostrongylus* înseamnă strongili subțiri ca un fir de păr). De multe ori se găsesc cu porțiunea anterioară înfiptă în mucoasa intestinală. Nu au capsulă bucală. Au o culoare roșiatică.

Produc ouă care seamănă cu acelea de ankilostomide — adică sînt ovalare, alungite, cu coaja subțire și transparentă. Înăuntrul lor celula-ou se găsește divizată într-un mare număr de blastomere. Ouăle sînt mai lungi ca cele de ankilostomide, ajungînd la o lungime de 2 ori mai mare decît grosimea. În general, 80—90 pe 40—45 de microni. Unul din polii ovoidului e mai ascuțit ca celălalt și ovalul oului prezintă o foarte ușoară asimetrie, convexitatea uneia din fețe fiind mai mare decît a celei opuse (Ho Thi Sang).

Ajunse în mediul extern ouăle lasă să iasă larva rabditoidă (care poate fi formată în 24 de ore). Aceasta năpîrlește și se transformă în larvă strongiloidă. La rîndul ei, aceasta din urmă năpîrlește din nou, dar rămîne închistată în cămașa de năpîrlire, ca și la ankilostomide. Spre deosebire de ankilostomide însă, la trichostrongilide pătrunderea prin piele este excepțională. Infestarea se face prin ingerarea de către gazda definitivă a larvelor infestante, care se ridică pe firele de iarbă (sau alte vegetale). Ajunsă în intestinul gazdei definitive larva se dezchistează și prezintă la unele



Scanned with OKEN Scanner

specii o schiţare de ciclu perienteric, mărginit la aceea că larva pătrunde şi rămîne îngropată puţină vreme în grosimea mucoasei intestinale.

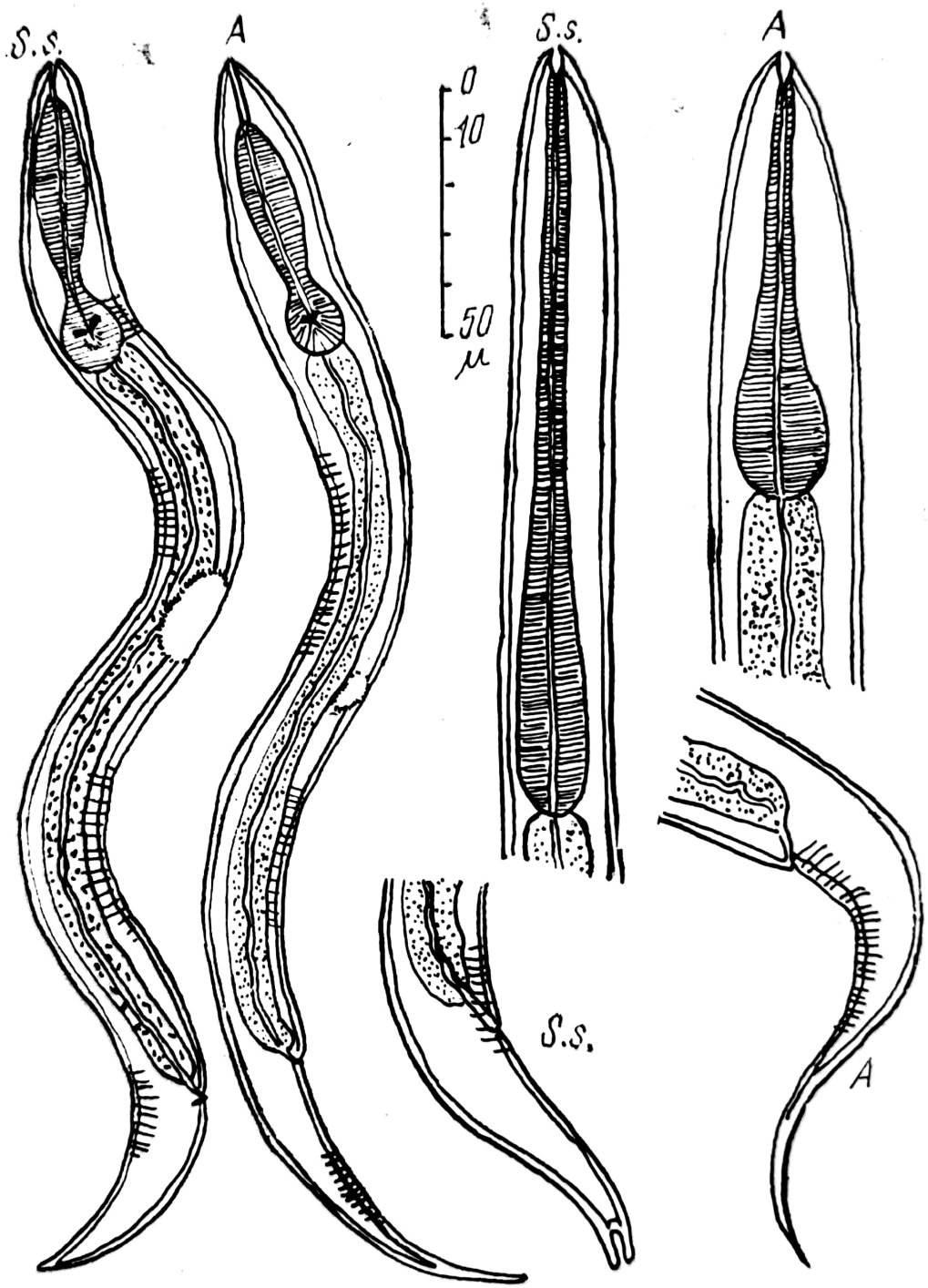



*Fig. 80.* — Larve de *Strongyloides stercoralis* (S.s.) şi *Ankylostoma duodenale* (A). În stînga, larva rabditoidă. În dreapta, larva filariformă (sus, extremitatea anterioară, jos, extremitatea posterioară) (după Yves Golvan).



Scanned with OKEN Scanner

Omul poate fi parazitat de unele specii ale genului *Trichostrongylus*. Se găsesc deci (dar nu prea frecvent) în scaune şi ouă de *Trichostrongylus*. Specia cea mai frecvent întîlnită la om în Europa pare a fi *Tr. colubriformis*. Masculul măsoară 4—5 mm, femela, 5—6 mm, iar ouăle au 80—90 de microni pe 40—45 microni.

Specia parazită la om ar putea însă fi şi *Tr. retortaeformis, Tr. axei, Tr. probolurus* şi altele. Dimensiunile ouălor nu sînt suficiente pentru a deosebi, una de alta, aceste specii. Numai găsirea adulţilor ne va permite un diagnostic corect. Ei au dimensiuni apropiate de cele de mai sus, deci necaracteristice, dar ce este caracteristic pentru determinarea speciei este punga copulatoare a masculilor.

Găsirea adulţilor se poate face în 2 feluri :

1. administrarea unui medicament eficace şi căutarea paraziţilor eliminaţi, prin tamizaj sau prin decantări repetate ; cum adulţii sînt foarte mici, trebuie depusă multă atenţie în această operaţie. Ca medicament putem utiliza Mintezolul ;

2. realizarea de coproculturi pe cărbune : larvele strongiloide infestante apar în 10—15 zile. Ele trebuie introduse la cobai printr-o sondă, pe cale bucală. Cobaiul se parazitează ; el trebuie însă sacrificat după o lună, adică cît mai curînd după timpul necesar pentru dezvoltarea completă a adulţilor de *Trichostrongylus* şi apariţia de ouă în materiile fecale, pentru că viermele nu e bine adoptat la cobai şi acest animal se debarasează curînd de tricostrongili.

## Elemente parazitare de trecere de origine animală, susceptibile a fi găsite în scaune

Vom cita aici ouăle de *Heterodera radicicola,* care se întîlnesc cu o deosebită frecvenţă. Sînt ouă mari, măsurînd 90—100 pe 40 de microni. Foarte alungite, posedă o morulă în dezvoltare. Una din feţe este concavă. La cei 2 poli se găseşte cîte o mică formaţie ovalară caracteristică. Este vorba de un parazit al unor



Scanned with OKEN Scanner

vegetale care intră în alimentaţia omului şi care poate fi introdus la om cu aceste vegetale (fig. 81).

Vom mai cita ouă şi adulţi de *Anguillula aceti*, rabditid care se poate dezvolta ca un „vierme coprozoic", în materiile fecale expuse mai multă vreme la aer. Vanni arată că expunînd la aer

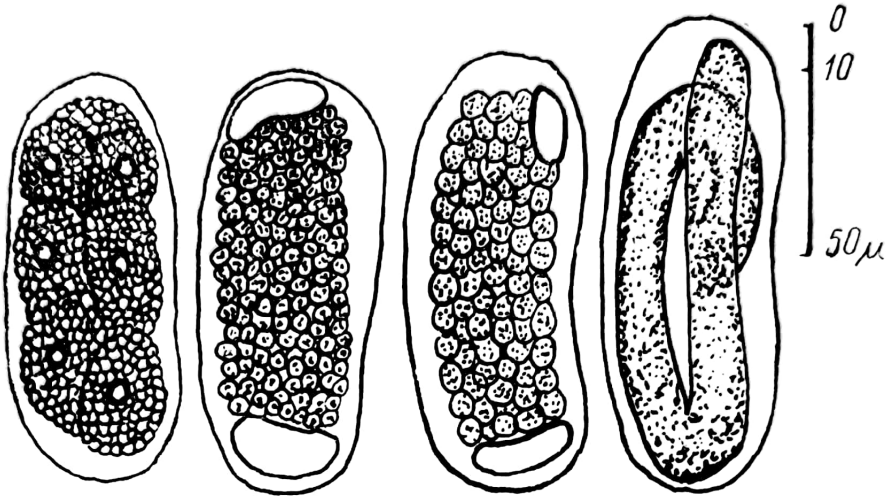



*Fig. 81.* — Ouă de *Heterodera radicicola* (după M. Langeron şi M. Rondeau du Noyer).

oţet de vin, în care am introdus miez de pîine, în cîteva zile găsim mediul de mai sus populat cu numeroare exemplare de *Anguillula aceti*. La fel, unele exemplare se pot dezvolta şi în materiile fecale din ouă purtate prin atmosferă (vînt, praf). Viermele adult nu trebuie confundat cu *Strongyloides stercoralis*. E mai mare, iar orificiul vulvar la femelă se găseşte în treimea posterioară a corpului, pe cînd la *Strongyloides stercoralis* la mijlocul corpului. Ouăle sînt şi ele mai mari, măsoară 80 de microni, sînt ovalare, cu coaja subţire, iar larva formată în ele se încolăceşte de mai multe ori asupra ei însăşi (fig. 82 şi 83).

**Artropodari susceptibili a fi întîlniţi în analizele coproparazitologice.** De multe ori apar în materiile fecale — în special vara — larve de muscide. Provenienţa lor poate fi diferită.

Uneori e vorba de o contaminare a materiilor după depunere. Diverse muscide care frecventează latrinele au putut depune ouă înainte ca materiile fecale să fi fost aduse la analiză. Se pot găsi astfel larve de *Eristalis tenax* (viermi codaţi). O atenţie mai mare la recoltare poate evita asemenea cazuri (fig. 84).

Se poate însă să fie vorba şi de o trecere reală a unor larve de muscide prin tubul digestiv, fie că a fost vorba de o adevărată



Scanned with OKEN Scanner

miază (în care larvele rămîn o bucată mai lungă sau mai scurtă de vreme în tubul digestiv), fie că este vorba de simpla ingerare a lor cu diverse substanţe alimentare şi eliminate repede cu materiile fecale.

N. Leon insista asupra posibiltăţii larvelor de *Sarcophaga* sau de alte specii de muscide de a parazita în abcese de măsele. Unele

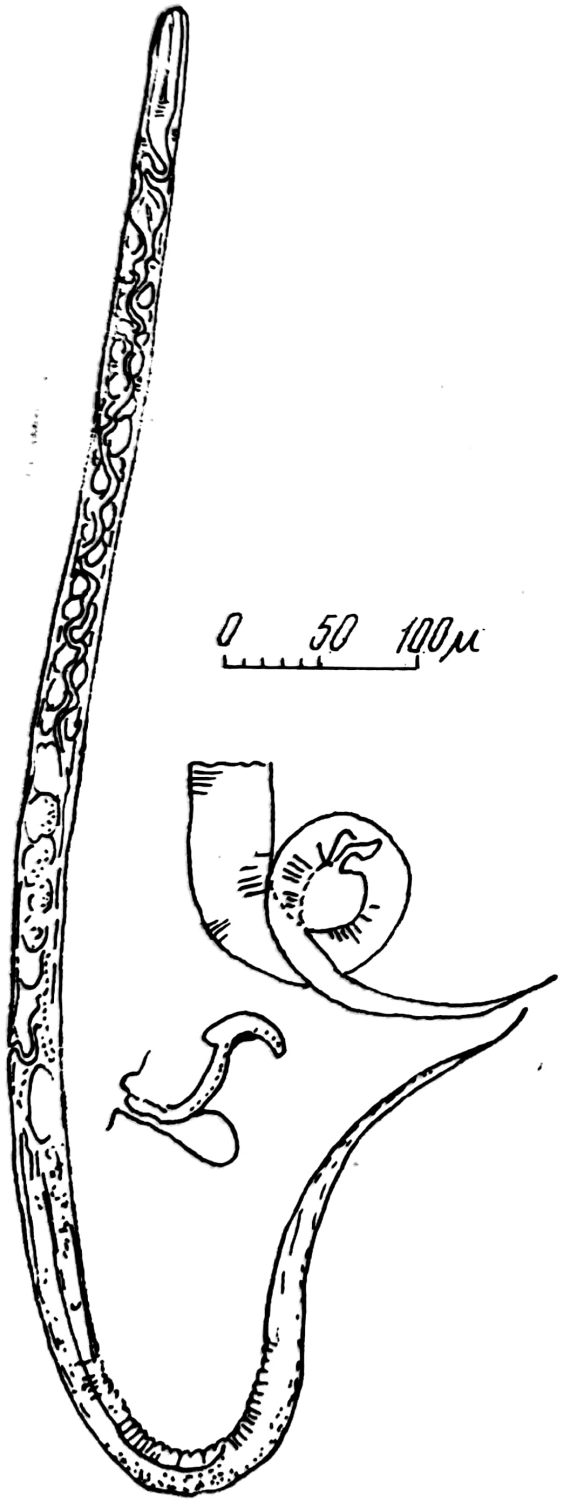



Fig. 82

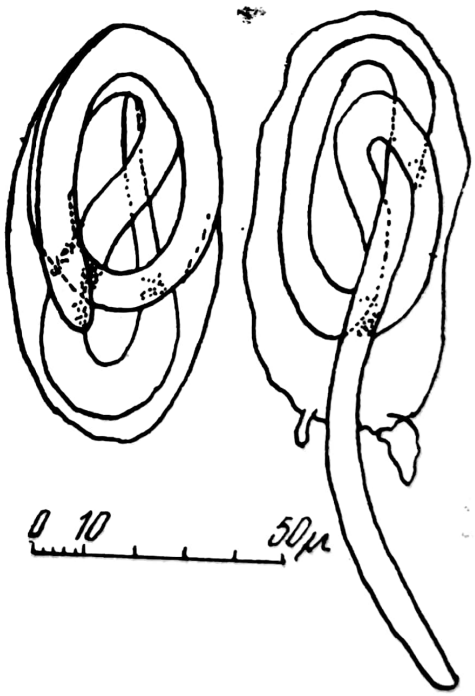



Fig. 83

Fig. 84

*Fig. 82.* — *Anguillula aceti* femelă (după M. Langeron şi M. Rondeau du Noyer).

*Fig. 83.* — Ouă de *Anguillula aceti* (după M. Langeron şi M. Rondeau du Noyer).

*Fig. 84.* — Larvă de *Eristalis tenax* (după E. Martini).



Scanned with OKEN Scanner

din aceste larve ieşite din abcese pot fi înghiţite şi trecute prin tubul digestiv, de unde ajung în fecalele eliminate (fig. 85).

Graham Smith şi Pulvis — pe baza unui articol al lui Nicolson — admit putinţa unor muscide de a depune ouă sau chiar larve în jurul orificiului anal, în timpul cît unii indivizi se găsesc în closetele publice, şi larvele, ca în fenomenul de retrofecţiune din

Fig. 85

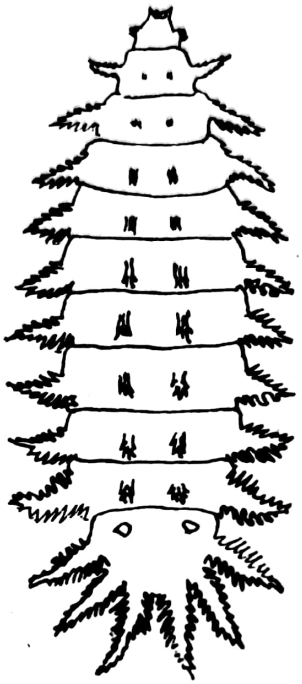


Fig. 86

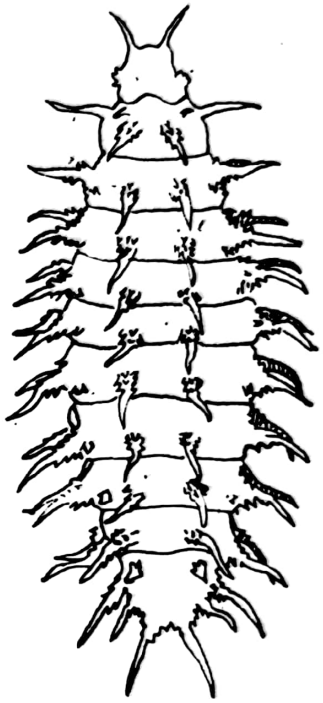


Fig. 87

*Fig. 85.* — Larvă de *Sarcofaga (Wohlfartia) magnifica* (după E. Brumpt).

*Fig. 86.* — Larvă de *Fannia scalaris* (după Hewitt, în Graham-Smith).

*Fig. 87.* — Larva de *Fannia canicularis* (după Hewitt, în Graham-Smith).

oxiuriază se introduc activ în rect. Se citează cazuri în care unele larve de diptere au fost găzduite mai mult timp în intestin, provocînd o miază adevărată, cu fenomene dureroase abdominale, congestii şi hemoragii ale mucoasei intestinale şi tulburări nervoase care fac necesară o intervenţie terapeutică.

Faust şi Russel notează ca susceptibile a fi găsite în materiile fecale numeroase larve de muscide, dintre care citǎm pe *Musca domestica, Muscina stabulans, Fannia canicularis, Fannia scalaris, Piophila casei* şi altele. Dintre acestea cele mai frecvent întîlnite de autori şi de noi au fost larvele de *Fannia,* fie *F. canicularis,* fie *F. scalaris,* a căror înfăţişare e cu totul caracteristică prin franjurile pe care le prezintă pe segmentele lor (fig. 86 şi 87).



Scanned with OKEN Scanner

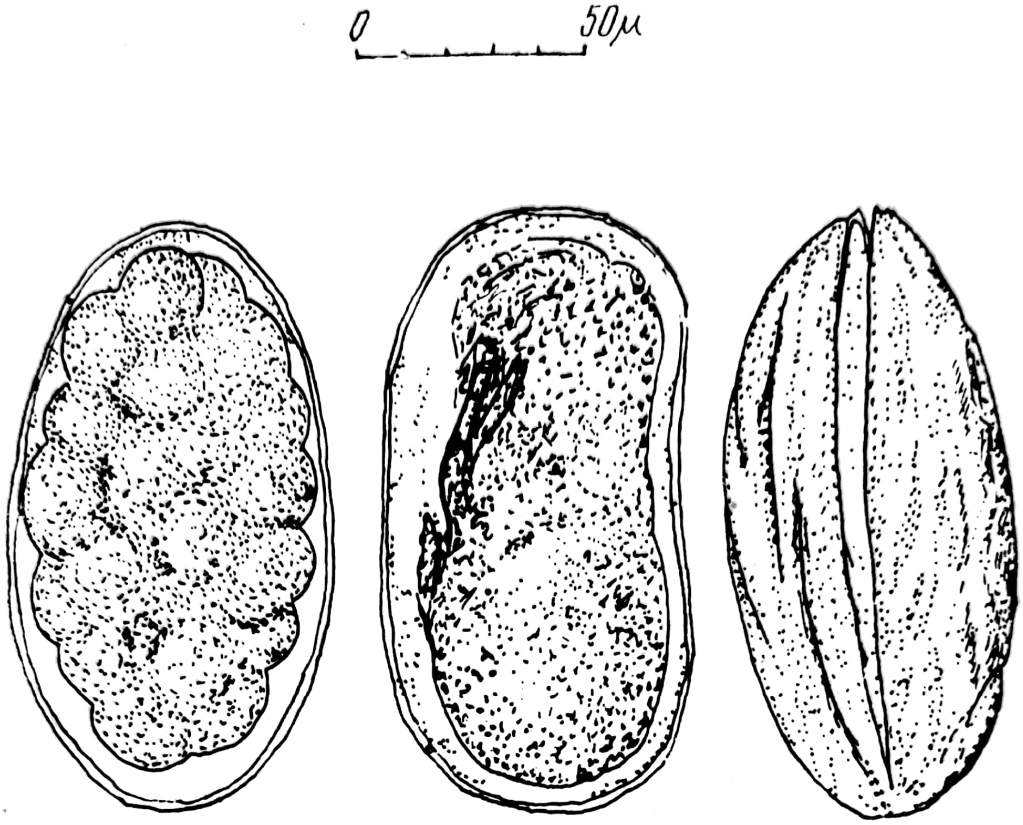



*Fig. 88.* — Ouă de *Tyroglyphus farinae* (în dreapta, coaja golită de conținut) (după M. Langeron și M. Rondeau du Noyer).

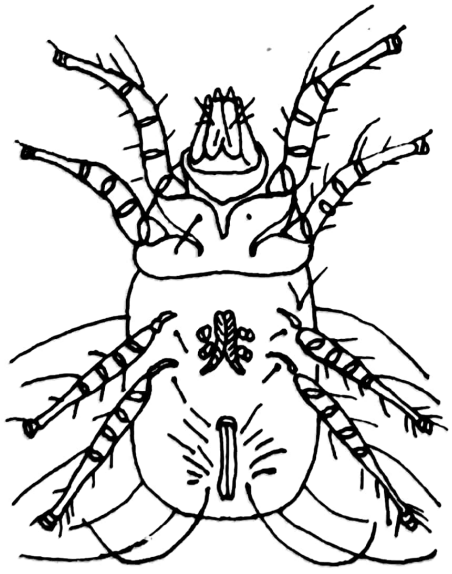


*Fig. 89.* — *Tyroglyphus siro* femelă (după P. Megnin).

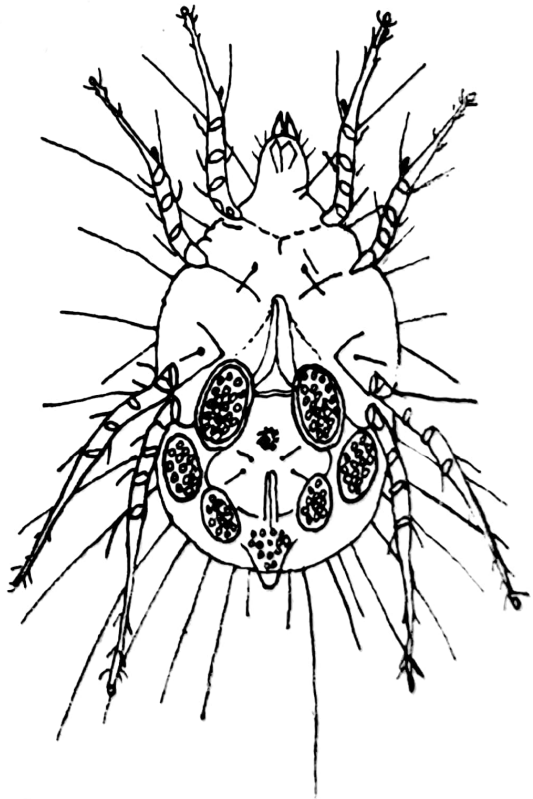


*Fig. 90.* — *Glyciphagus cursor* femelă (după P. Megnin).



Scanned with OKEN Scanner

Foarte adeseori se întîlnesc în materiile fecale şi acarieni adulţi — în diverse stadii de evoluţie — şi ouă de acarieni. Acestea din urmă sînt mari (depăşesc 100 de microni), ovalare, cu coaja subţire, iar înăuntrul lor prezintă o diviziune celulară care respectă o simetrie bilaterală. Uneori se văd prin transparenţa peretelui oului articolele din care sînt alcătuite unele din perechile de picioare, ceea ce face sigură determinarea (fig. 88). Nu e vorba de o parazitare, ci de o ingestie accidentală cu diverse alimente rău conservate sau în compoziţia cărora au intrat substanţe în care se produsese dezvoltarea acarienilor — aşa cum e făina în care se poate găsi *Tyroglyphus siro* şi alţi acarieni, marmelada rău conservată etc. Am observat de curnd un asemenea caz în care o întreagă familie prezenta în materiile fecale extrem de numeroşi acarieni. Toţi acarienii erau morţi. Unii în fragmente. Una din persoane se plîngea de dureri abdominale. Un purgativ drastic şi o alimentaţie controlată a dus repede la dispariţia şi a acarienilor, şi a fenomenelor dureroase, care probabil erau provocate pe cale alergică prin fenomenul de alergie la acarieni (fig. 89 şi 90).

## Elemente neparazitare susceptibile a fi găsite în scaune

Vom cita în această categorie o serie de formaţiuni care nu trebuie confundate cu elementele de parazitare.

**Peri vegetali** — foarte frecvent întîlniţi (fig. 91). Ar putea fi confundaţi de cei fără experienţă cu larve sau adulţi de nematode, dar se deosebesc net de aceştia, prin pereţii lor foarte groşi, care înconjură un tub capilar fără nici o altă organizaţie. Nematodele

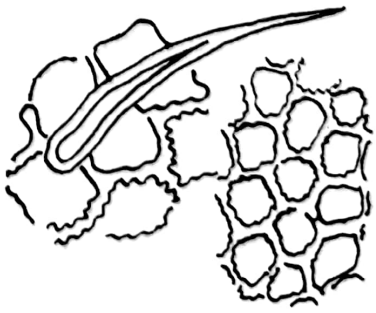


*Fig. 91.* — Păr vegetal şi placard epidermic (după Ho Thi Sang).



Scanned with OKEN Scanner

prezintă în genere o cuticulă foarte fină, cu striaţii fine transversale şi în interior o organizaţie bine distinctă (esofag, intestin, aparat reproducător etc.).

**Peri animali.** Au în general un ax medular care apare negru din cauza aerului pe care-l include. Uneori au o suprafaţă parcă solzoasă, formată din celule imbricate (fig. 92).

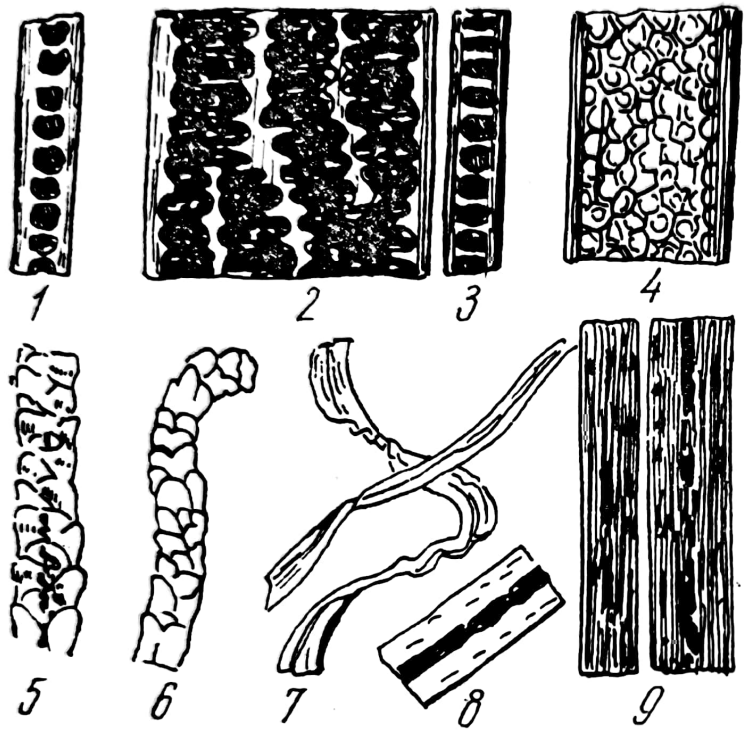



*Fig. 92.* — Fragmente de păr şi fibre: *1* — păr de şobolan; *2* — păr de iepure; *3* — puf de iepure; *4* — păr de căprioară; *5—6* — fire de lînă; *7* — fire de bumbac; *8* — păr uman alb; *9* — păr uman castaniu (după M. Langeron şi M. Rondeau du Noyer).

**Spori de criptogame.** Vom cita pe *Tilletia tritici* (Ciuperca grîului), care apare în analize cu o deosebită frecvenţă. Se prezintă ca sfere mici (20—25 de microni), brune, cu o suprafaţă areolată. Au fost confundate de unii cercetători neatenţi cu ouă de ascarizi, în ciuda deosebirii de mărime între aceste 2 elemente. Eroarea e cît se poate de uşor de evitat (fig. 93).

**Artrospori de Geotrichum.** După ce îşi rotunjesc colţurile, artrosporii capătă o formă alungită, ovoidală, în care ar putea fi confundaţi cu chisturi de *Endolimax* sau cu chisturi de Giardia. Prezenţa pe aceeaşi preparaţie de artrospori cu colţuri rectangulare tipice, uneori chiar de filamente pe cale de separare, şi aspectul după coloraţia cu lugol prin care nu se găsesc formaţiile caracteristice acelor chisturi împiedică a se face o atare confuzie.

**Blastospori** şi uneori chiar filamente de levuri din genul *Candida*. Formele pe cale de înmugurire sînt foarte caracteristice.



Scanned with OKEN Scanner

**Alte elemente care se pot întîlni cu oarecare frecvenţă în scaune** sînt următoarele :

**Portocale şi lămîi.** Unele celule din pulpa de portocale şi lămîi — cu o parte mai groasă şi una mai subţire — pot simula un helmint. Lipsa de orice altă organizaţie arată că nu e vorba de helminţi. Aspectul lor e aşa de caracteristic, că este suficient să le fi văzut o dată, pentru a nu le mai confunda cu nici un alt element (fig. 94).

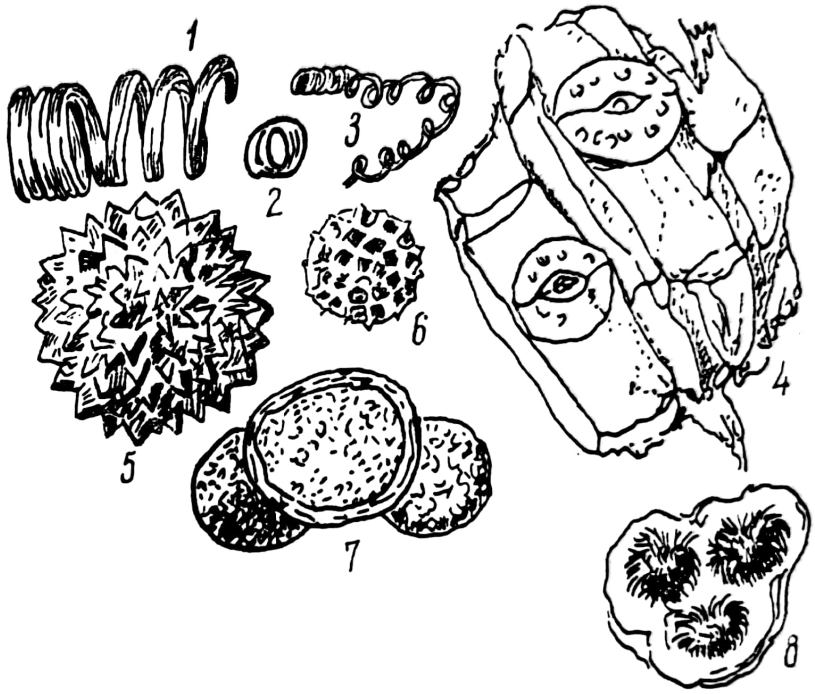



*Fig. 93.* — Resturi vegetale susceptibile a fi găsite la examenul coproparazitologic : *1, 2, 3* — tracheide, vase spiralate ; *4* — epidermă de varză cu stomate ; *5* — polen de anghinare ; *6* — spor de *Tilletia tritici* ; — *7* — polen de conifere ; *8* — ascospori de trufe (după M. Langeron şi M. Rondeau du Noyer).

**Celule epiteliale de descuamaţie.** Cele anale sînt bine conservate. Sînt poliedrice, mari, cu nucleu mare. Cele intestinale sînt în parte alterate. Ele sînt alungite şi înglobate în mucus. Adeseori sînt infiltrate cu săpunuri.

**Cristale.** Se pot întîlni cristale de oxalat de calciu, de fosfat amoniacomagnezian şi cristale Charcot-Leyden.

*Fig. 94.* — Fragmente din pulpa de portocale şi lămîi (după M. Langeron şi M. Rondeau du Noyer).



Scanned with OKEN Scanner

Cristalele de oxalat de calciu, cînd sînt libere, au de obicei forma de plicuri caracteristice. Ele pot fi datorate unei fermentaţii anormale. Sînt solubile în acid acetic. Sînt foarte refringente.

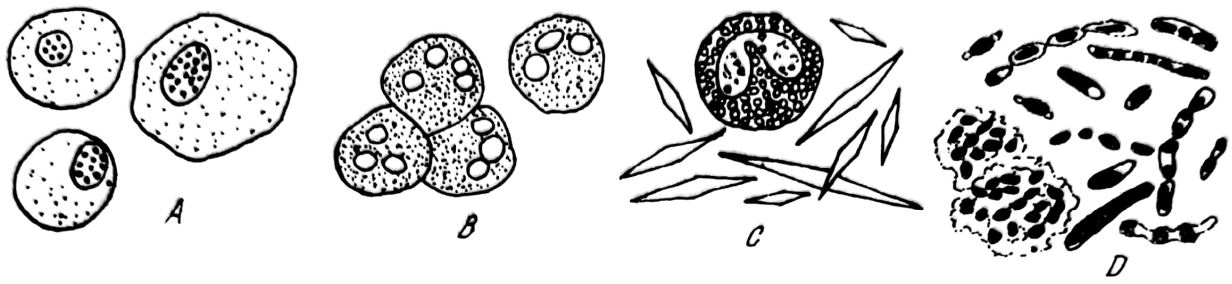



*Fig. 95.* — *A* — celule epiteliale ; *B* — leucocite ; *C* — un polinuclear eozinofil şi cristale Charcot-Leyden ; *D* — flora iodofilă (după Ho Thi Sang).

*Fig. 96.* — Cristale de oxalat de calciu în celule de leguminoase (după M. Langeron şi M. Rondeau du Noyer).

Uneori sînt însă de origine alimentară şi se întîlnesc incluse în unele celule de leguminoase (spre exemplu, de fasole). Fiecare celulă poate avea în mijlocul său un singur cristal a cărui formă e de prismă dreaptă alungită, uneori cudată (fig. 96).

Cristalele de fosfat amoniaco-magnezian au forma bine cunoscută de capace de sicriu. Ele se găsesc în urinile foarte alcaline. Sînt refringente şi solubile în acid acetic. Apar în cazuri de putrefacţii albuminoide şi atunci cînd materiile fecale au venit în contact cu urina şi pot reprezenta o mărturie a acestei erori comise la recoltare.

Cristalele Charcot-Leyden se prezintă ca două fiare de lance sau ca două triunghiuri alungite, reunite prin bazele lor. Au mai fost comparate cu o cute de ascuţit. Pot avea diferite mărimi şi diferite vîrste. Pot ajunge pînă la 100 de microni, cum pot fi şi de 8—10 microni. Uneori au marginile neregulate, cu mici crestături. Ele apar de obicei acolo unde apar şi celulele eozinofile, aşadar în cursul parazitismului intestinal (cu protozoare sau cu helminţi) sau în alergiile intestinale. Sînt soluţile atît în acizi, cît şi în alcali. Prezenţa cristalelor Charcot-Leyden trebuie să ne îndemne să căutăm mai departe, cu deosebită atenţie, elemente parazitare, în cazul unei analize negative pentru paraziţi. O căutare repetată va sfîrşi aproape întotdeauna prin a le găsi.



Scanned with OKEN Scanner

În sfîrşit, vom spune cîteva cuvinte asupra a 4 elemente susceptibile a fi găsite în scaune şi care prezintă un interes deosebit pentru interpretarea funcţiilor digestive, fapt pentru care prezenţa

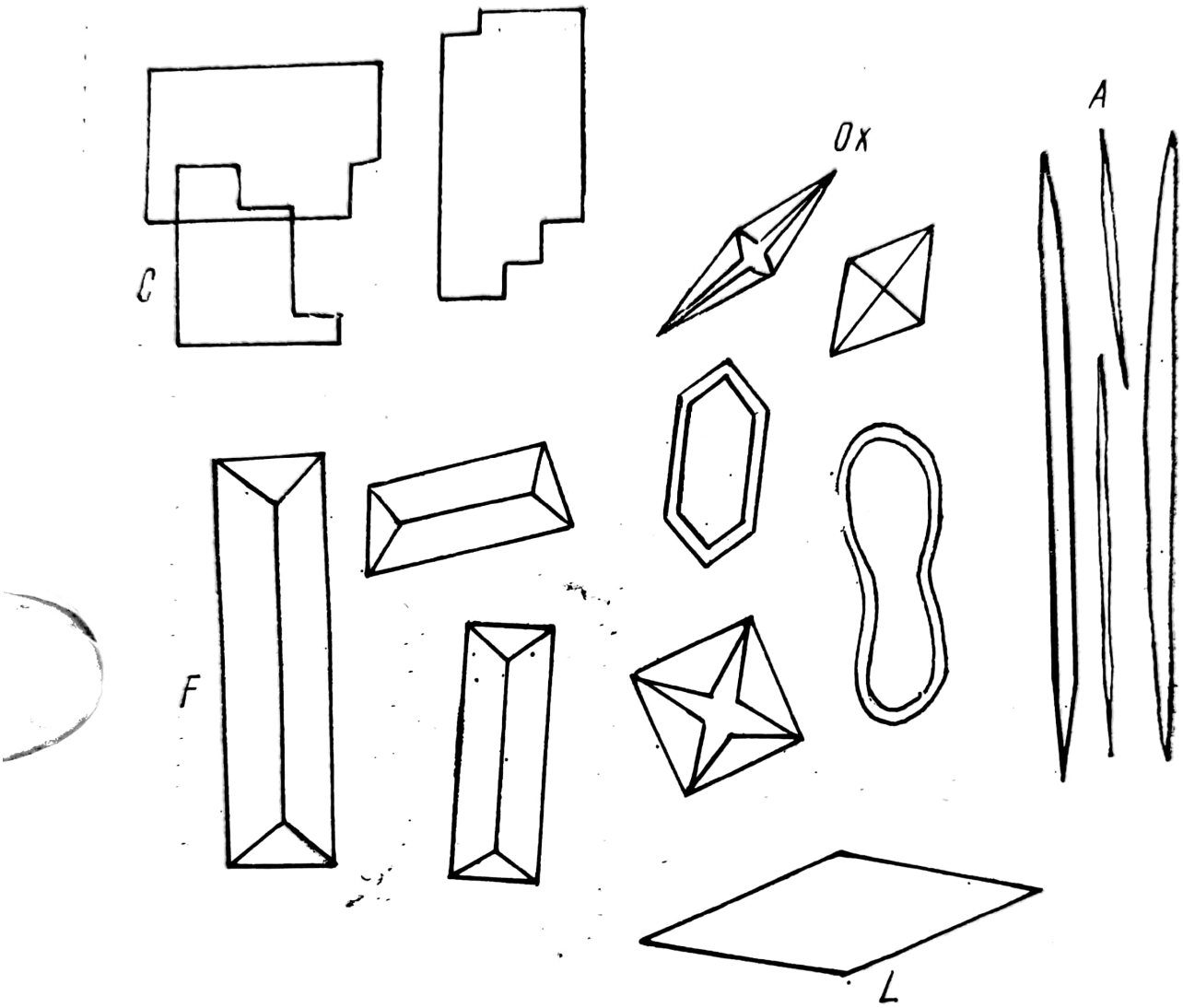



*Fig. 97.* — Cristale diverse susceptibile a fi găsite la examenul coproparazitologic : *C* — colesterină ; *F* — fosfat amoniaco-magnezian ; *Ox* — oxalat de calciu ; *L* — Cristal Charcot-Leyden ; *A* — acizi graşi.

lor trebuie notată pe buletinele de analiză. Acestea sînt : fibrele musculare, lipidele, amidonul şi flora iodofilă (fig. 98).

1. **Fibrele musculare.** Se va preciza starea lor de digestie. O fibră musculară bine digerată şi-a pierdut striaţiile şi se prezintă ca nişte corpi ovalari, fără nici o organizaţie : corpii lui Notnagel. De la fibra musculară cu colţurile drepte, cu striaţia longitudinală şi transversală completă, pînă la corpii lui Notnagel, există



Scanned with OKEN Scanner

un lung şir de grade intermediare, care pot fi incluse în una din următoarele 3 categorii : fibre complet digerate, fibre parţial digerate, fibre complet nedigerate. Lipsa de digestie a fibrelor musculare dovedeşte o insuficienţă gastrică şi pancreatică.

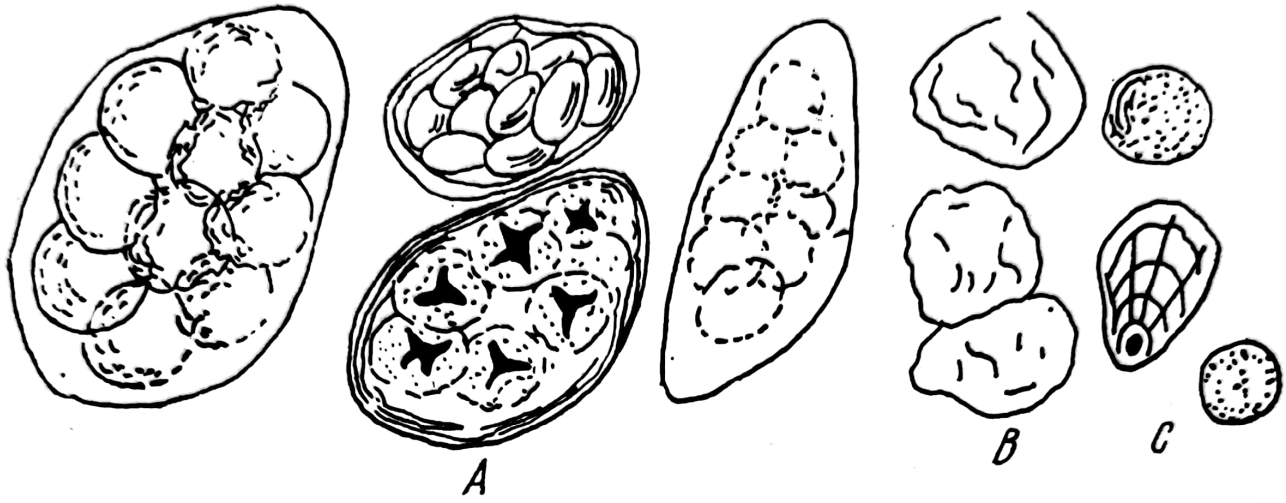



*Fig. 98.* — *A* — celule de feculente în diverse grade de digestie ; *B* — celuloză digestibilă ; *C* — amidon crud (după Ho Thi Sang).

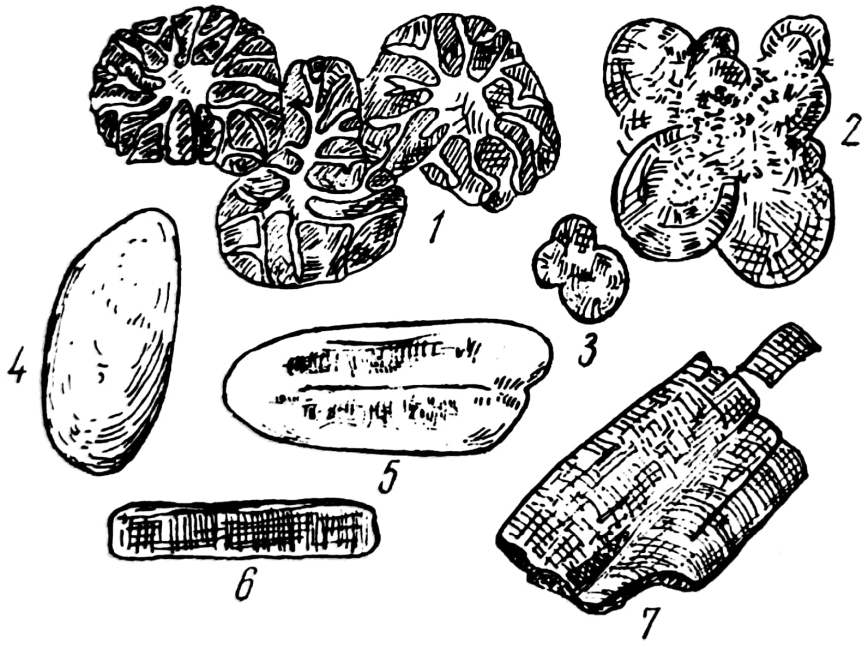



*Fig. 99.* — *1* — celule scleroase (pară) ; *2, 3* — nisip intestinal (săpunuri calcare sau magneziene) ; *4—7* — fibre musculare în diverse grade de digestie. În *4* (celula Nothnagel), orice striaţie dispare, în urma digestiei complete. În *7* fibrele sînt complet nedigerate (după M. Langeron şi M. Rondeau du Noyer).

2. **Lipidele.** Ele se pot prezenta în scaune sub formă de picături de grăsimi neutre, sub formă de acizi graşi (caz în care pot avea şi forma de picături, dar mai caracteristică este aceea de ace lungi şi subţiri), şi, în sfîrşit, sub forma de săpunuri în combinaţie cu alcalii. Săpunurile pot fi amorfe — pot fi în formă de ace scurte şi groase — precum şi în forma unor mase policiclice cu un desen circular şi radial, care le dă asemănarea cu secţiuni printr-un trunchi de copac.



Scanned with OKEN Scanner

Pentru diferenţierea grăsimilor neutre de acizii graşi se poate folosi colorarea cu Sudan III, albastru de Nil sau cu reactivul lui Bailenger, pe care l-am descris mai sus la coloraţia nucleelor din chisturile de amibe. Cu acest din urmă reactiv, care conţine cristal violet şi fuxină bazică, grăsimile neutre se colorează în lilas, iar acizii graşi în roşu-violet (ciclamen) ; săpunurile, în diverse nuanţe de roşu şi portocaliu (Bailenger).

Prezenţa lipidelor în cantitate mare (steatoree) poate semnifica o insuficienţă biliară şi pancreatică, precum şi o deficienţă a funcţiei de absorbţie.

3. **Grăunţe de amidon.** Se prezintă ca grăunţe foarte refringente, intracelulare (atunci cînd învelişul de celuloză digestivă în care se găsesc incluse nu a fost digerat), sau extracelulare. Se pun în evidenţă cu soluţie lugol, care le colorează în violet, roz sau brun, în raport cu starea de digestie în care se găsesc. Digestia lor începe prin amilaza din salivă şi din secreţia pancreatică, dar e desăvîrşită de flora microbiană cecală. Prezenţa amidonului nedigerat arată un tranzit accelerat şi, cu atît mai mult, dacă se găsesc şi celulele în care e inclus amidonul, celule care sînt formate din celuloză digestibilă şi care trebuie să fie digerate înaintea grăunţelor de amidon.

4. **Flora iodofilă** pusă în evidenţă prin coloraţia cu lugol, care o colorează violet-închis, e o mărturie a unui tranzit accelerat care aduce pînă în rect această floră. Normal flora iodofilă ar fi trebuit să fie înlocuită cu flora de putrefacţie în cursul trecerii materiilor în lungul colonului stîng.

# Examenul micologic

Din toate cele 4 capitole ale parazitologiei : Protozoologia, Helmintologia, Entomologia şi Micologia, acesta din urmă este în general mai puţin cunoscut şi, înainte de a intra în acest capitol, cred



Scanned with OKEN Scanner

că ar fi binevenită lămurirea unor termeni indispensabili pentru buna înţelegere a oricărei expuneri de micologie. Să începem adică prin ceea ce unul dintre noi obişnuia să numească la cursurile sale : „alfabetul micologiei".

Micologia se ocupă cu studiul morfobiologic şi cu rolul patogen al ciupercilor parazite. Micologia medicală se ocupă cu studiul morfobiologic şi rolul patogen al ciupercilor parazite la om.

Ciupercile parazite poartă încă numele de fungi — aşa precum viermii paraziţi poartă numele de helminţi.

Orice fung se compune în esenţă din două părţi, care reprezintă cele două tendinţe pe care le are orice vieţuitoare : aceea de a trăi (deci aceea vegetativă) şi aceea de a se reproduce şi împrăştia (deci aceea reproducătoare). Partea vegetativă poartă încă numele de „tal", iar cea reproducătoare, de „spor" şi „aparat sporifer".

Există fungi la care talul şi sporul se confundă. Nu există un corespondent morfologic pentru fiecare din ele, ci în unele momente acelaşi element morfologic funcţionează ca tal, iar în altele ca spor. Asemenea fungi se mai numesc „holocarpici", în opoziţie cu fungii „eucarpici", la care există o netă deosebire morfofiziologică între ceea ce este vegetativ (tal) şi ceea ce este reproducător (spor).

Talul poate fi celuloglobular. Fungul este reprezentat prin celule izolate, globuloase, sferice sau ovoide. Uneori ovoide foarte alungite. Uneori piriforme, atenuate mult la o extremitate a ovoidului — dînd înfăţişarea comparabilă cu aceea a lacrimilor (stalagmoide).

Alteori se prezintă sub forma de filamente — tal filamentos. Filamentele formează împreună un „miceliu", iar fiecare filament poartă încă numele de „hifă".

Hifele pot fi subţiri. Diametrul lor poate fi sub un micron. Zicem atunci că talul este „microsifonat". Cînd diametrul hifelor depăşeşte un micron, putînd ajunge la 2—3 microni, talul este „macrosifonat".

Hifele pot fi continue, adică reprezentate printr-un perete extern, înăuntrul căruia se găseşte o masă protoplasmatică şi numeroase nuclee. Acesta e talul cenotic. Altă dată talul este compus din hife septate prin pereţi transversali. În acest caz despărţiturile au un număr neregulat de nuclee (1—6 nuclee). Ele nu au deci semnificaţia unor celule.



Scanned with OKEN Scanner

Hifele se pot dispune uneori în smocuri, în fascii groase, care devin vizibile cu ochiul liber. Aceste smocuri constituite din hife paralele poartă numele de „coremium“ (fig. 100).

Alteori hifele se întreţes, se anastomozează între ele şi alcătuiesc un fel de ţesuturi care poartă denumirea de „pseudoparen-

*Fig. 100.* — Coremium.

chim“. Pseudoparenchimul poate fi lax şi uşor de dilacerat cu 2 ace fine. Alteori e dens, legat strîns prin apariţia unui ciment care leagă hifele între ele. Cînd este lax poartă încă numele de „prozenhim“, iar cînd este dens, pe acela de „plectanhim“. Un plectanhim se mai numeşte în micologie şi „stroma“. Micile tubercule care se dezvoltă uneori pe secară şi poartă numele de „secară cornută“ (din care se extrage ergotina) nu sînt decît un pseudoparenchim al unei ciuperci parazite. La suprafaţă tuberculul este constituit printr-un plectanhim, iar în interior un prozenhim, în care se găsesc acumulate materiale de rezervă nutritivă. O asemenea formaţiune parazitară se mai numeşte şi „sclerot“.

**Sporul.** Există la fungi două feluri de spori. Unii sînt născuţi dintr-un proces sexualizat. Aceştia sînt sporii „perfecţi“. Ei se nasc în urma contopirii a 2 celule cu valori sexuale opuse. Alţi spori apar direct pe filamente — în afara oricărui prealabil proces sexualizat. Sînt sporii „imperfecţi“.

S p o r i p e r f e c ţ i. Avem în primul rînd „oosporul“. Se formează în felul următor : unele filamente dau naştere la un gametocit femel (în micologie se numeşte un gametangiu femel), care se umflă la capăt în formă de sferă. Acesta este „oogonul“. În oogon se dezvoltă „oosfera“, echivalentă cu gametul femel (fig. 101).

Tot din acelaşi filament din care s-a format oogonul se formează un filament special, cu valoare de gametangiu mascul. Se mai numeşte „anteridie“. Acesta se cudează şi se alipeşte de oogon, iar o porţiune din protoplasma anteridiei pătrunde în oogon şi se contopeşte cu oosfera. Astfel se naşte „oosporul“ sau „oul“.



Scanned with OKEN Scanner

*Zigosporul.* Un alt spor sexualizat e „zigosporul". Se caracterizează prin aceea că 2 filamente dau fiecare naștere la o prelungire transversală, cu potențialitate sexuală deosebită. Aceste prelungiri reprezintă cei 2 gametangii care se contopesc și dau naștere la zigospor. Gametangiii pot fi perfect egali și asemănători (e o izo-

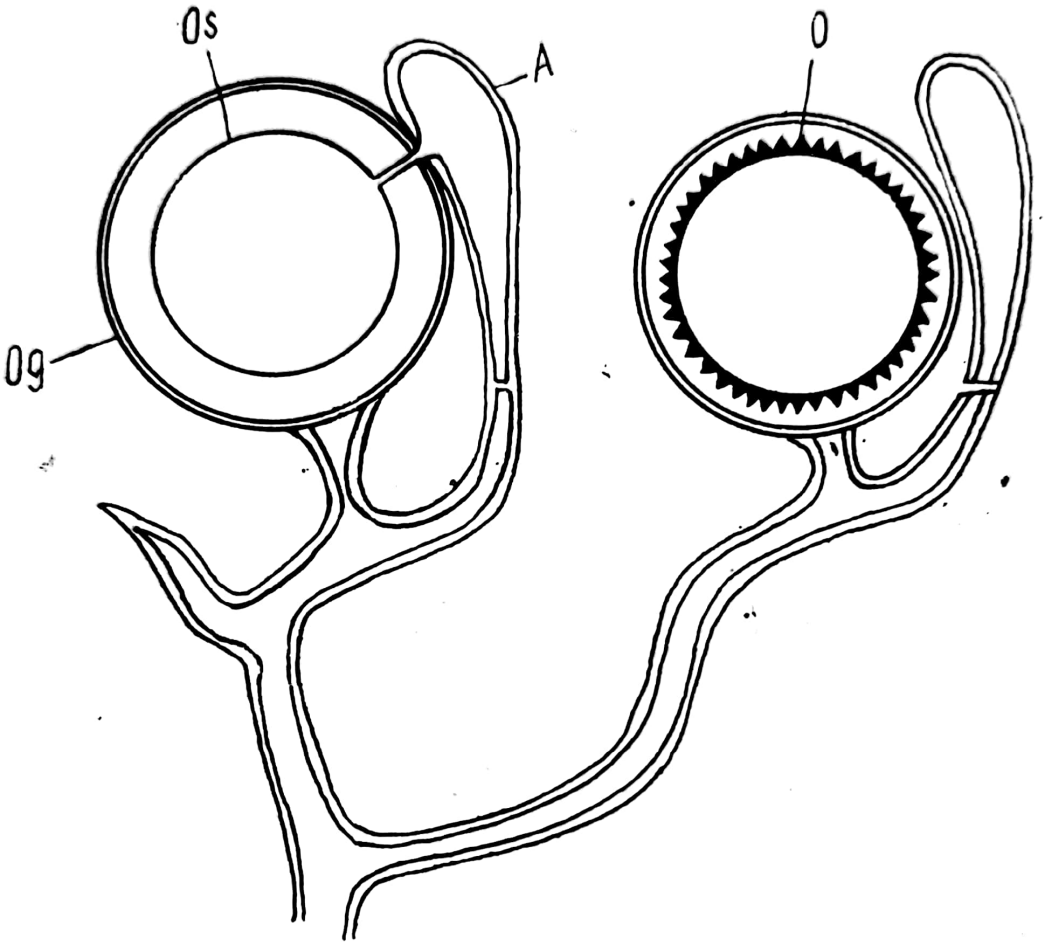



*Fig. 101.* — Formarea oului la *Peronospora*. *Og* — oogon ; *Os* — oosfera ; *A* — anteridie ; *O* — oul (după Daguillon și Matruchot).

gamie perfectă) sau unul e mai mare și altul mai mic (izogamie imperfectă). Zigosporii se pot produce în talul aceluiași fung, pornit din același spor. Gametangiii cu potențialități sexuale deosebite, dar pe care morfologic nu-i putem deosebi unul de altul, îi desemnăm cu plus și minus. Există unele ciuperci la care însă tot talul e unisexuat și pentru obținerea de zigospori trebuie să însămînțăm, în aceeași eprubetă, un „tal plus" și „unul minus". Asemenea fungi se mai numesc și *heterotalici*, spre deosebire de primii,



Scanned with OKEN Scanner

la care în acelaşi tal există şi gametangii masculi şi gametangii femeli şi care se mai numesc *homotalici* (fig. 102).

*Ascosporul.* A treia categorie de spori sexuaţi sînt *ascosporii.* Ei se nasc în formaţii saculare, pe un aparat sporifer special, care face tranziţia între tal şi spor şi care poartă numele de „hime-

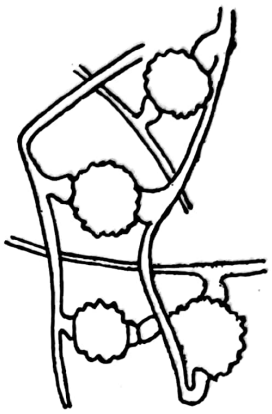


*Fig. 102.* — Zigospori de *Mucor racemosus* (după Paul Vuillemin).

nium". Himenium este de fapt un pseudoparenchim, deci o formaţie vegetativă, dar în care o parte se specializează în producerea de asce, care se nasc prin contopirea prealabilă a unor celule cu potenţialităţi sexuale deosebite. Un exemplu de asemenea aparat sporifer sexualizat e acela care poartă numele de „peritecă". Se prezintă ca o sferă alcătuită din prozenhim. Sfera are un orificiu care poartă numele de „ostiolă", iar opus ostiolei se găseşte „himenium" pe care se formează ascele. Tot un fel de himenium se găseşte şi la ciupercile „cu pălărie" de cîmp. El se găseşte dedesubtul pălăriei şi produce în loc de asce şi ascospori, bazidii şi bazidiospori (fig. 103).

La fungii paraziţi se produc asce în care se găsesc 2-4-8-16 ascospori (în general un multiplu de 4) (fig. 104).

Dar asce se pot forma şi în afară de himenium. Ele se pot produce şi la fungii celuloglobulari. Două forme ovoidale capătă la un moment dat potenţialităţi sexuale deosebite. Ele se contopesc. Rezultă o formaţie mai mare care se goleşte pe dinăuntru, transformîndu-se într-o formă ovalară sau sferică goală (asca) înăuntrul căreia se formează ascosporii. Aci se poate ivi o excepţie. Uneori ascele se nasc la aceşti fungi fără să fi existat la naşterea lor o prealabilă contopire sexuală. În acest caz însă ascosporii care se produc vor fi sexualizaţi şi vor trebui să se contopească doi cîte doi, înainte de a-şi continua dezvoltarea obişnuită.

S p o r i i i m p e r f e c ţ i. La fungii holocarpici, după cum am văzut mai sus, nu există o deosebire morfobiologică între tal şi spor.



Scanned with OKEN Scanner

Asemenea spori sînt numiţi încă şi talospori ; talosporii sînt de două feluri : blastosporii şi artrosporii.

*Blastosporul.* Pe o celulă globuloasă apare la un moment dat un mugure. Acesta creşte progresiv şi se transformă pînă la urmă într-o altă celulă asemănătoare cu aceea care i-a dat naştere. E

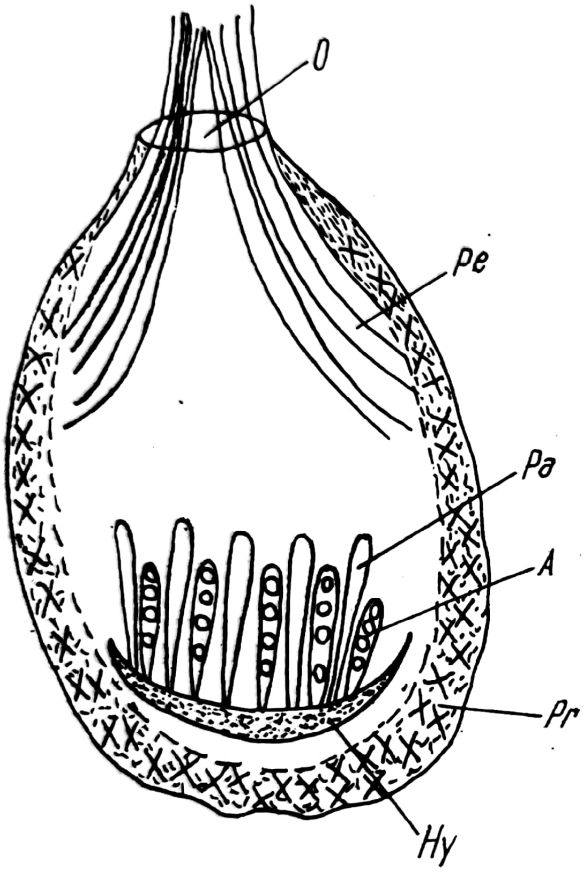



*Fig. 103.* — O peritecă (schematic) : *Hy* — hymeniu ; *A* — asce ; *Pa* — parafize ; *Pe* — perifize ; *Pr* — prozanhim ; *O* — ostiolă.

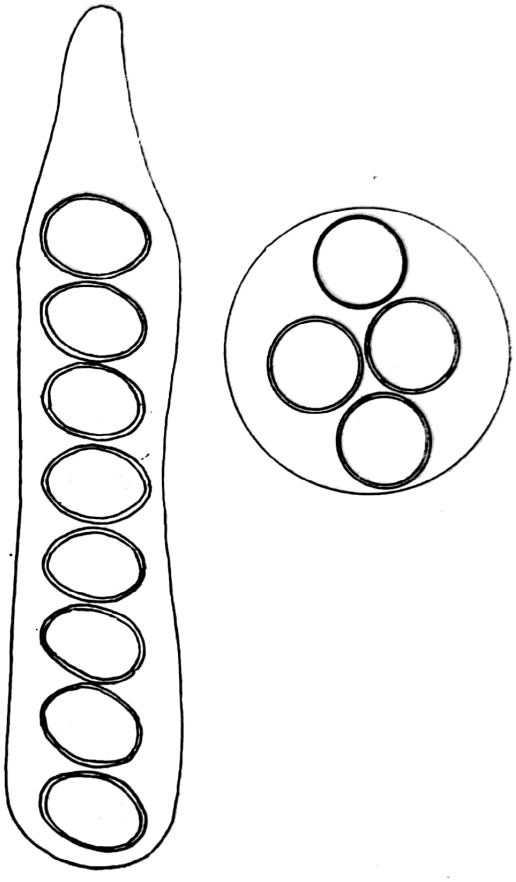


*Fig. 104.* — Tipuri de asce cu ascospori (schematic).

sporul de înmugurire (blastosporul). Cînd după formarea sa blastosporul nu se desprinde de pe celula mamă şi, în schimb, se alungeşte considerabil, şi, dacă la rîndul său dă naştere la capătul distal la un mugure care va creşte la fel cu părintele său, se va alungi la fel, şi procesul va continua şi la mugurii următori, se formează o succesiune de forme cilindrice alungite, care alcătuiesc un filament. Nu este însă vorba de un filament adevărat, ci de un „pseudofilament", un „pseudomiceliu". Acesta e cazul majorităţii covîr-



Scanned with OKEN Scanner

şitoare la filamentele produse de fungii din genul *Candida*, de care ne vom ocupa, în special, în rîndurile de mai jos (fig. 105).

*Artrosporul.* Fungul produce hife adevărate. La un moment dat însă o asemenea hifă se fragmentează în o mulţime de fragmente dreptunghiulare care se desprind, se rotunjesc la colţuri şi devin

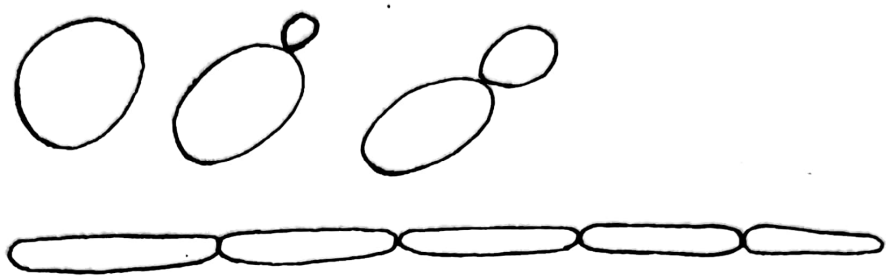


*Fig. 105.* — Sus, blastospori. Jos, pseudomiceliu.

spori. Sînt sporii de dezarticulaţie sau „artrosporii". Acelaşi filament a servit la început ca hifă şi s-a transformat direct şi total în spori. E deci vorba tot de talospori (fig. 106).

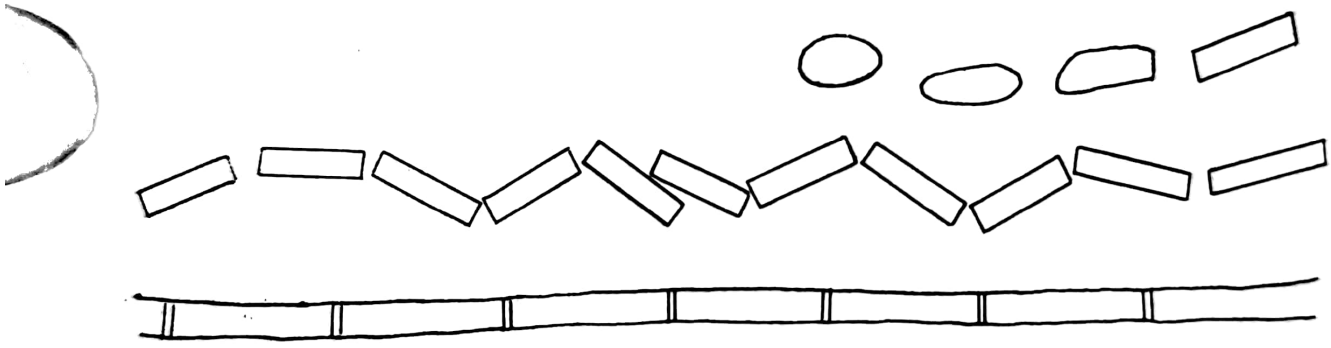


*Fig. 106.* — Artrospori (spori de dezarticulaţie).

Sporii imperfecţi ai fungilor eucarpici. Prezintă un deosebit interes din punctul de vedere al sistematicii, putînd caracteriza unele genuri de fungi.

Aleuria. Este un spor fix. Pe un filament se produc înmuguriri laterale, care se transformă în spori prin condensarea de protoplasmă. Filamentul care a dat naştere aleuriilor rămîne pînă la urmă secătuit de protoplasmă, moare şi se distruge, liberînd astfel sporii pe care i-a produs.

Clamidosporul. Este o aleurie mare, prin concentrarea unei mari cantităţi de protoplasmă din filament. Se îmbracă cu o coajă groasă şi rezistă la condiţii atmosferice nefavorabile, ca uscăciunea. Poate apărea la capătul filamentului (clamidospor terminal) sau în lungul lui (intercalar). Ca şi în cazul aleuriei, filamentul se



Scanned with OKEN Scanner

goleşte de protoplasmă şi moare, iar clamidosporul este pus în libertate. Principala deosebire între aleurie şi clamidospor constă în aceea că aleuria e mai mică şi că reprezintă un element constant, format întotdeauna de anumite specii de fungi. Prezenţa ei e utilizată în sistematică, e un element sistematizat. Clamidosporul apare ocazional, inconstant şi nu poate fi utilizat decît excepţional în sistematică. El se poate naşte pe diverse hife de diverşi fungi, în raport nu cu specia în sine, ci cu diverse condiţii de mediu nefavorabile, cu excepţia clamidosporilor fungilor : *Candida albicans* şi *Candida stelatoidea*, de care ne vom ocupa mai jos.

C o n i d i a. Este sporul imperfect cel mai deseori întîlnit. Se naşte pe filamente, ca şi aleuria, dar spre deosebire de aceasta, conidia nu este fixă, ci caducă. Reprezintă un element valabil pentru caracterizarea unor fungi prin culoare, formă, precum şi prin modul în care este prinsă de filament. Uneori este prinsă direct, adică fără un pedicul. Se numeşte atunci „conidie sesilă". Alteori prezintă un pedicul mai lung sau mai scurt. Sînt cazuri cînd se naşte pe un organ special născător de conidii, care poartă numele de „fialidă". Conidiile pot fi izolate, grupate, dispuse în lanţuri. Pot avea suprafaţa netedă sau plină de asperităţi.

Există unele conidii mari — septate — sînt „macroconidiile". Ele pot avea forma unor fusuri. Alteori au o structură murală, despărţită în loji, prin pereţi verticali şi orizontali.

S p o r a n g i o s p o r u l. E vorba de spori cu o origine deosebită. La un moment dat de pe miceliu, care se găseşte culcat pe un suport, se ridică un filament special. Acesta se umflă sub forma unei sfere la capătul distal, iar partea umflată se separă printr-un perete despărţitor de restul filamentului. Peretele despărţitor va deveni columela, iar partea sferică terminală, sporangiu ; în sporangiu se formează sporangiosporii, care se liberează prin distrugerea sporangiului (fig. 107).

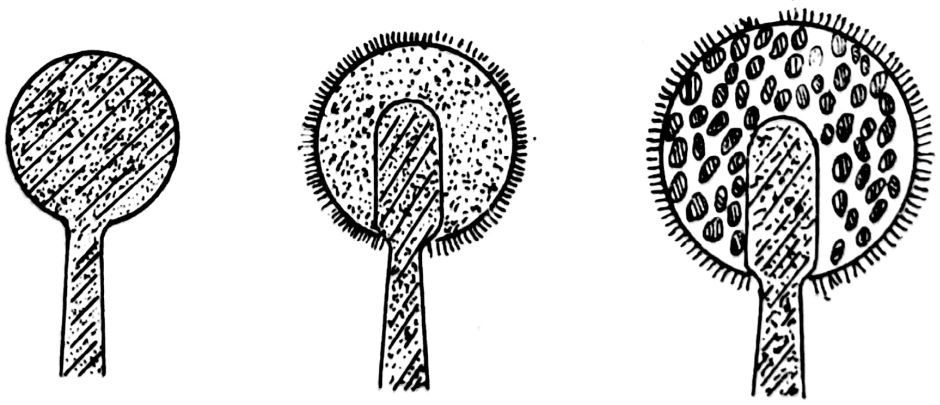


*Fig. 107.* — Sporangiu cu sporangiospori de *Mucor mucedo* (după Daguillon şi Matruchot).



Scanned with OKEN Scanner

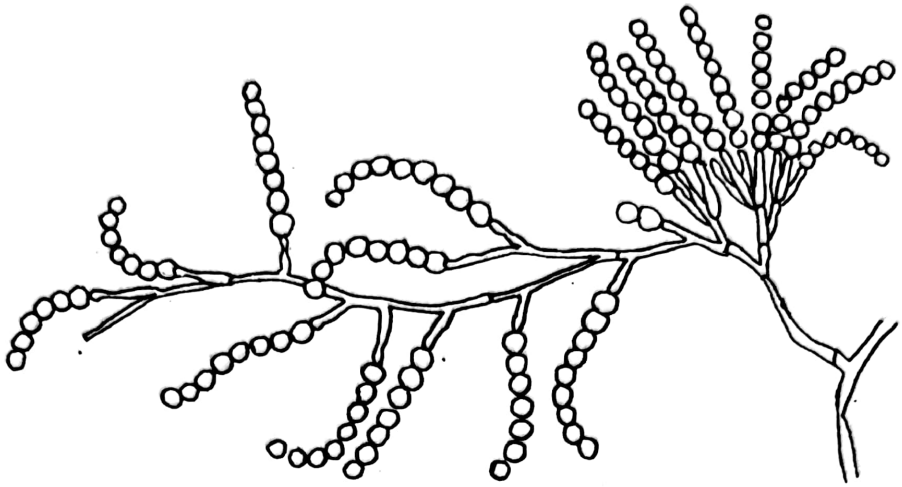


*Fig. 108.* — *Scopulariopsis brevicaulis*, aspectul în cultură (după E. Brumpt).

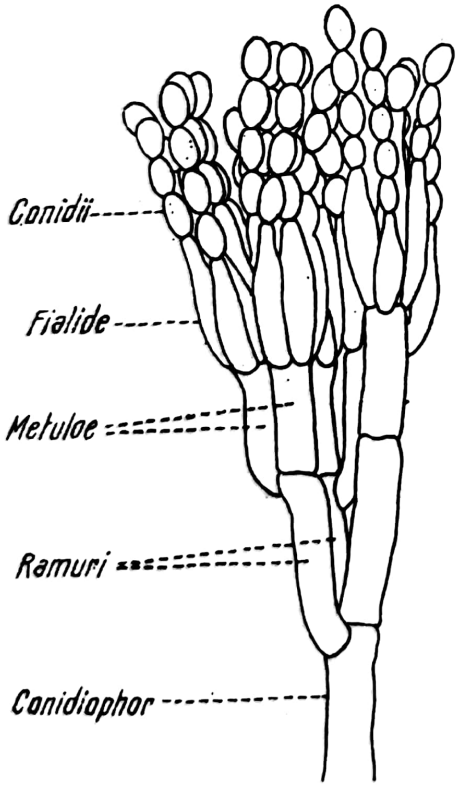



*Fig. 109.* — Tipul de fructificație „penicilium" (după Raper, Thom și Fennel).

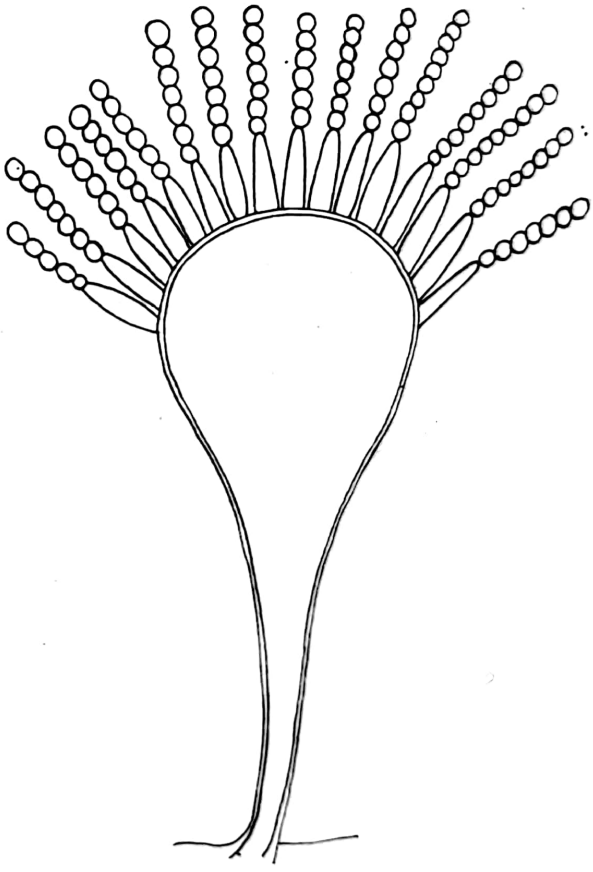


*Fig. 110.* — Tipul de fructificație „aspergilus".



Scanned with OKEN Scanner

Să revenim acum la conidiile care se nasc pe fialide. Există 4 tipuri deosebite de fungi cu fialide.

*Tipul „scopulariopsis“*. Pe un filament poate naşte direct sau după o diviziune a filamentului, o fialidă care dă naştere la un şirag de conidii. Uneori se găsesc 2 sau 3 fialide alăturate, constituind un fel de buchet. Alteori fialidele sînt izolate.

*Tipul „penicilium“*. Un filament se bifurcă în 2, acestea iar în 2, şi se formează, prin mai multe bifurcaţii, ca un evantai. La capătul fiecărei ramuri de bifurcaţie se formează o fialidă, care va da cîte un şirag de conidii. Aparenţa generală a unui asemenea aparat sporifer e acela al unei pensule.

*Tipul „aspergilus“*. Filamentul sporifer va crea mai întîi o dilataţie sferică terminală. Pe aceasta se dispun radial fialide, iar fiecare fialidă produce un şirag de spori. Acest aparat sporifer cu sporii lui dă impresia unui cap de stropitoare, din care se scurg şiroaie de apă. De aici îi vine şi numele de *aspergilus.*

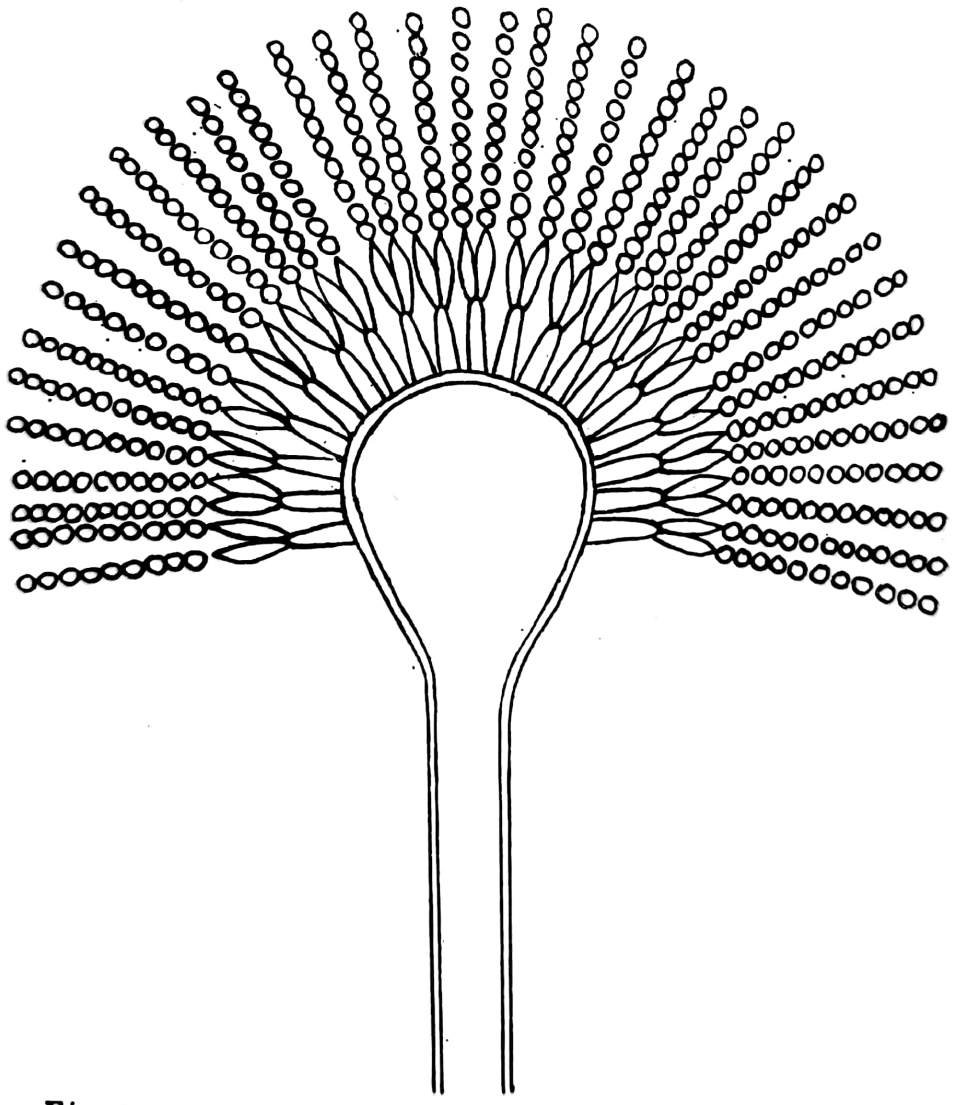


*Fig. 111.* — Tipul de fructificaţie „sterigmatocystis“.



Scanned with OKEN Scanner

*Tipul „sterigmatocistis"*. Se prezintă la fel, cu deosebirea că există 2 etaje de fialide. Fialidele de gradul 1 dau naștere la fialide de gradul 2, iar acestea, la șiragurile de conidii.

Această înfățișare a aparatului sporifer a dat și fungilor care le poartă un nume de gen corespunzător. Vom avea genurile *Scopulariopsis, Penicilium, Aspergilus* și *Sterigmatocistis.*

## Clasificarea fungilor

Clasificarea fungilor ține seama întîi de faptul dacă sporii prin care se face propagarea lor sînt perfecți sau imperfecți. Pe această bază toți fungii paraziți la om pot fi împărțiți în trei clase, și anume :

**Clasa Phicomicete.** Cuprinde fungi care au putința ca pe lîngă spori imperfecți (și anume sporangiospori) să producă și spori perfecți, de tipul zigospori sau oospori. Fungii phicomiceți paraziți la om produc ca spori perfecți numai zigospori. Ficomicetele sînt *cenocitice* adică au un miceliu continuu, neseptat.

**Clasa ascomicete.** Cuprinde fungi care, pe lîngă spori imperfecți, — pot să producă și spori perfecți, de tipul ascospori.

**Clasa hifomicete** sau **adelomicete.** Nu posedă decît exclusiv spori asexuați imperfecți. Ele se împart în *Hifomicete talosporate* (blastospori și artrospori) și *conidiosporate* sau *aleuriosporate.* La rîndul lor conidiosporatele se împart în 3 ordine, după modul de formare al conidiilor, și anume :

*Sporotrichate,* la care conidiile se formează pe filamente direct (cum e cazul lui *Rinocladium*).

*Sporoforate,* la care conidiile se formează pe un conidiofor specializat (sporofor) pentru a le produce și care, în general, se ridică vertical pe filament (cum e cazul la genul *Cefalosporium*).

*Fialosporate,* la care conidiile se formează pe acele organe particulare denumite fialide (cum e cazul la genurile *Penicilium, Aspergilus, Sterigmatocistis, Scopulariopsis*).

**Clasă de așteptare.** Adelomicetele reprezintă însă pentru mulți fungi o simplă clasă de așteptare, în care ei nu pot fi menținuți pînă nu se dovedește că au putința de a produce și asce. În acel moment ei sînt scoși din clasa adelomicete și trecuți în aceea a ascomicetelor. Să dăm, ca un exemplu unele conidiosporate fialidosporate la care s-a descoperit că pot produce în culturi peritece cu asce. Acest fapt nu le modifică întru nimic aparatul sporifer. Un penicilium care produce asce rămîne din punctul de vedere al aparatului sporifer tot un peniciliu. Dar trecînd în altă clasă, trebuie



Scanned with OKEN Scanner

să i se schimbe şi numele de gen. Se creează astfel ceea ce numim genurile paralele. Acest peniciliu se va numi la ascosporate *Carpenteles* — gen paralel cu genul penicilium de la adelomicete. La fel un *sterigmatocistis* va deveni la ascosporate un *Diplostephanus*, iar un *Aspergilus* un *Eurotium*.

## Mediile de cultură

Rezultă din cele de mai sus că aparatul sporifer al fungilor prezintă un deosebit interes pentru caracterizarea lor. Pentru a-l obţine este de cele mai multe ori absolut necesar să scoatem fungul din viaţa parazitară (în care se dezvoltă mai mult aparatul vegetativ) şi să-l trecem în viaţa saprofită — ceea ce realizăm prin cultivarea lui pe diverse medii.

Cele mai utilizate medii pentru cultura fungilor sînt următoarele : mediul Sabouraud, gelozat şi negelozat, adăugat sau nu cu cloramfenicol şi actidionă, mediul Gorodkova, mustul de bere, mediul Raulin, mediul P.C.B., mediul Czapek şi mediul cu apă de orez. Vom da, pe scurt modul lor de preparare.

**Mediul Sabouraud** gelozat (modificat de M. Langeron).

Se amestecă într-un balon de 2 litri :

| | |
|---|---|
| Glucoză | 20 g |
| Peptonă | 10 g |
| Geloză | 20 g |
| Apă | 1 000 ml |

Se pune la autoclav, pe care-l urcăm încet (în curs de 20 de min. cel puţin) pînă la 120°C. Se stinge focul îndată ce s-a ajuns la temperatura de mai sus. Luăm aceste precauţii pentru a evita caramelizarea glucozei. Prin caramelizare zahărul nu numai că îşi pierde puterea hrănitoare, dar devine chiar toxic pentru fungi.

Se filtrează printr-un strat de vată hidrofilă, prin care a trecut înainte apă caldă, pentru a evita prinderea gelozei. E de preferat a se fi pus la acelaşi autoclav o pîlnie garnisită cu stratul de vată, iar la tubulura pîlniei va fi fost pus un tub de cauciuc, continuat cu un vîrf de pipetă Pasteur, scurtă şi groasă.

În cursul însăşi al filtrării se va face şi repartizarea mediului de tuburi (cîte 7—8 ml în fiecare tub). Pentru această operaţie se va aplica o pensă Mohr pe tubul de cauciuc, între pîlnie şi tubulura de sticlă a pipetei Pasteur. E bine ca tuburile cu dopurile lor să fi fost în prealabil bine sterilizate la pupinel. Se va avea grijă



Scanned with OKEN Scanner

ca în cursul repartizării să nu se murdărească cu lichidul gelozat porţiunea superioară a tuburilor în regiunea în care intră dopurile.

Se pun apoi tuburile la sterilizat la autoclav cu aceleaşi precauţii ca la început, adică ridicînd temperatura la 120°C pe încetul (cu o singură coroană de gaz) şi stingînd focul îndată ce s-a ajuns la această temperatură.

La scoaterea din autoclav tuburile vor fi culcate pe o tijă de lemn sau de sticlă, pentru ca la răcirea gelozei să obţinem mediul în plan înclinat.

Dacă tuburile au fost dinainte sterilizate, dacă filtrarea şi repartizarea se va face cu toate măsurile de asepsie, dubla sterilizare a mediului în condiţiile arătate e suficientă pentru a obţine un mediu steril în care zahărul nu a fost caramelizat. Acest din urmă fapt se recunoaşte după culoarea mediului, care nu trebuie să bată înspre roşu, ci înspre albăstrui.

**Mediul Sabouraud negelozat.** Se prepară la fel, dar nu se pune geloză. În cazul acesta tuburile nu vor mai fi înclinate la scoaterea din autoclav, după a doua sterilizare, ci vor fi lăsate vertical.

**Mediul Sabouraud cu cloramfenicol.** Este cel mai utilizat pentru izolări de fungi din medii contaminate (cum sînt, spre exemplu, materiile fecale). Se utilizează cloramfenicolul în cantitate de 0,5 g‰. El se adaugă în balon după prima sterilizare — înainte de filtrare — şi se scutură bine balonul pentru dispersiune uniformă.

Unii autori recomandă să se adauge pe lîngă cloramfenicol şi actidionă (cicloheximidă), în aceeaşi cantitate de 0,5 g‰. Actidiona este un antibiotic antifungic, care împiedică creşterea unor fungi contaminanţi. Prin dezvoltarea lor aceştia pot înăbuşi dezvoltarea unor fungi patogeni. Totuşi actidiona poate inhiba şi creşterea unor fungi patogeni, cum sînt : *Criptococcus neoformans,* unele specii de *Candida* şi unii aspergili patogeni, ca *Aspergilus fumigatus.*

**Mediul Gorodkowa.** Se deosebeşte de mediul Sabouraud prin faptul că nu conţine decît 1% glucoză, în loc de 2%.

Mediul a fost modificat de Lodder şi Kregger Van Rij, în sensul că i s-a redus cantitatea de glucoză la 1‰ (0,1%), s-a mărit cantitatea de geloză la 3% şi i s-a adăugat 0,5% clorură de sodiu. El va avea deci formula :

| | |
|---|---|
| Glucoză | 1 g |
| Peptonă | 10 g |
| Clorură de sodiu | 5 g |
| Geloză | 30 g |
| Apă | 1 000 ml |



Scanned with OKEN Scanner

H. Cassagne dă o formulă intermediară, reducînd glucoza numai la 2,5‰ (0,25%).

**Mustul de bere.** Se obţine de la o fabrică de bere must de bere blondă, fără hamei. Se sterilizează cît mai neîntîrziat, urcînd autoclavul încet, ca şi la mediul Sabouraud, pînă la 120°C. Se formează un precipitat. Se filtrează. Se repartizează lichidul în tuburi şi se sterilizează din nou, la fel ca şi întîia dată.

Dacă vrem să-l gelozăm, adăugăm geloză 20‰ ; se pune balonul la fiert, pînă la topirea gelozei, se filtrează prin vată înmuiată cu apă fierbinte şi se repartizează în tuburi. Se resterilizează încet, pînă la 120°C, ca şi la mediul Sabouraud.

**Mediul Raulin.** Este un mediu care nu permite dezvoltarea microbilor. Este deci utilizat pentru purificarea de microbi a tulpinilor de fungi izolate.

Are formula următoare :

| | | |
|---|---|---|
| Zahăr Candi (sau în lipsă, zaharoză) | 70 | g |
| Acid tartric . . . . . | 4 | g |
| Azotat de amoniu . . . . | 4 | g |
| Fosfat de amoniu . . . . | 0,60 | g |
| Carbonat de potasiu . . . . | 0,60 | g |
| Carbonat de magneziu . . . | 0,40 | g |
| Sulfat de amoniu . . . . | 0,25 | g |
| Sulfat de zinc . . . . . | 0,07 | g |
| Sulfat de fier . . . . . | 0,07 | g |
| Silicat de potasiu . . . . | 0,07 | g |
| Apă distilată . . . . . | 1 500 | ml |

După G. Bertrand (în Vanbreuseghem) se poate completa formula lui Raulin cu 0,07 g sulfat de mangan.

Pentru prepararea mediului de mai sus sînt necesare cîntăriri migăloase. Pentru a le evita putem avea făcute din timp soluţii mult mai concentrate, din care adăugăm în ml o cantitate care să aducă sarea respectivă la diluţia din formula de mai sus. Spre exemplu, pentru a avea 0,07 g din sulfatul de zinc, sulfatul de fier sau sulfatul de mangan, vom face soluţii de 7 g‰, din care vom pune cîte 10 ml, scăzînd, bineînţeles, apa distilată respectivă din cei 1 500 ml apă distilată, care trebuie să reprezinte totalul soluţiei Raulin. Soluţiile de carbonat de potasiu sau de fosfat de amoniu le vom face la fel 6 la 100, cea de carbonat de magneziu 4 la 100 şi vom lua din ele cîte 10 ml. Prin acest procedeu prepararea lichi-



Scanned with OKEN Scanner

dului Raulin, mediu aşa de preţios în micologie, se uşurează considerabil.

**Mediul P.C.B.** Acest mediu îşi trage numele de la iniţialele, în limba franceză, a celor trei ingrediente care îl compun : cartofi *(pomme de terre)*, morcovi *(carotte)* şi bilă *(bile)*. El se prepară astfel :

— se obţine prin radere pulpă de cartofi şi pulpă de morcovi şi se iau cîte 20 g din fiecare :

— se macerează o oră, într-un litru apă de robinet, se fierbe 5 min. ; se filtrează prin tifon dublu ; se lasă să se răcească ; se readuce lichidul la 1 000 ml cu apă de robinet şi se adaugă 25 g de geloză, precum şi 150 g bilă de bou proaspătă sau 1,5 g bilă uscată ;

— se pune la foc pînă se topeşte geloza ;

— se refiltrează prin vată şi se repartizează în eprubete ;

— se sterilizează la autoclav, 20 de minute, la 110°.

**Mediul Czapek.** Are următoarea formulă :

| | |
|---|---|
| Nitrat de sodiu . . . . . | 3 g |
| Fosfat monoacid de potasiu . . | 1 g |
| Clorură de potasiu . . . . | 0,5 g |
| Sulfat de magneziu . . . . | 0,5 g |
| Sulfat de fier $SO_4Fe+7\ H_2O$ . . | 0,01 g |
| Zaharoză . . . . . | 30 g |
| Geloză . . . . . | 15 g |
| Apă distilată . . . . . | 1 000 ml |

Avînd o cantitate ridicată de zaharoză se va steriliza cu precauţie ca şi mediul Sabouraud.

**Mediul cu orez** are formula de mai jos :

| | |
|---|---|
| Orez decorticat . . . . . | 20 g |
| Apă de robinet . . . . . | 1 000 ml |

— se fierbe trei sferturi de oră ;

— se filtrează prin tifon şi se lasă să se răcească ; se readuce cantitatea de apă la 1 000 ml ;

— se adaugă 20 g geloză ;

— se pune din nou la fiert, pînă la topirea gelozei ;

— se poate adăuga bilă proaspătă, 150—200 g ;

— se filtrează prin vată şi se repartizează în tuburi ;

— se sterilizează la autoclav 15 min., la 120°C.



Scanned with OKEN Scanner

## Cultura pe lamă

După cum am mai spus, în mediile de cultură fungii dezvoltă mult mai bine aparatele sporifere care îi caracterizează şi pe baza cărora putem să-i identificăm cel puţin ca gen. Dar pentru a obţine aparatele sporifere intacte este nevoie de cultivarea lor pe lamă. Într-o simplă amestecare a culturii într-o picătură de lugol legăturile dintre filamente şi spori sînt pierdute.

Există totuşi un mijloc rapid care poate da o orientare uneori satisfăcătoare, şi anume aceea de a lua din mediu gelozat, cu o ansă mai groasă, o porţiune mică de geloză, care să cuprindă ceva din regiunea periferică a culturii. Această porţiune se pune pe o lamă, într-o picătură de lugol, se acoperă cu o lamelă şi se trece prin flacăra foarte mică a unui bec de gaz. Geloza se topeşte şi se întinde sub lamelă. Procesul e ajutat şi prin presiuni uşoare exercitate asupra lamelei. În geloza astfel întinsă în pătură foarte subţire se observă la microscop filamentele fungului, uneori cu legăturile cu sporii bine păstrate.

O altă metodă care s-a utilzat multă vreme a fost cultura în picătură suspendată pe faţa inferioară a unei lame sau unei lamele, în spaţiul creat de o verighetă sau o sticlă aşezată pe o altă lamă. Este vorba, aşadar, de o verighetă de sticlă aşezată între 2 lame, de care este lipită cu lanolină. Lama sau lamela de deasupra poartă pe faţa ei inferioară o picătură de mediu de cultură lichid, însămînţată cu fungul respectiv. Această metodă este azi părăsită şi înlocuită prin cultivarea pe lamelă gelozată de care vom vorbi mai jos (fig. 112).

Cultura pe lamă este astăzi metoda cel mai mult utilizată şi considerată de nelipsit în toate cercetările micologice. Metoda propusă întîi de către Rivalier şi Seydel se practica în felul

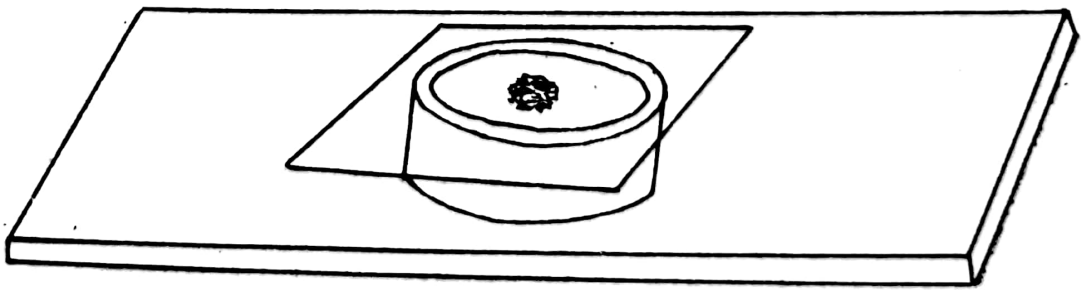


*Fig. 112.* — Cultura în picătură suspendată.



Scanned with OKEN Scanner

următor : se înmuia o lamă de microscopie într-un bocal în care se găsea mediu Sabouraud gelozat topit. Lama era apoi așezată într-o cutie Petri, pe un suport, și însămînțată pe fața sa superioară. Pe fundul cutiei Petri se punea puțină apă distilată. Se acoperea cutia cu capacul ei. După ce cultura se dezvolta se scotea lama, se ștergea de geloză, cu grijă, întreaga ei față inferioară și o parte din fața superioară neacoperită de cultură și se colora cultura dezvoltată.

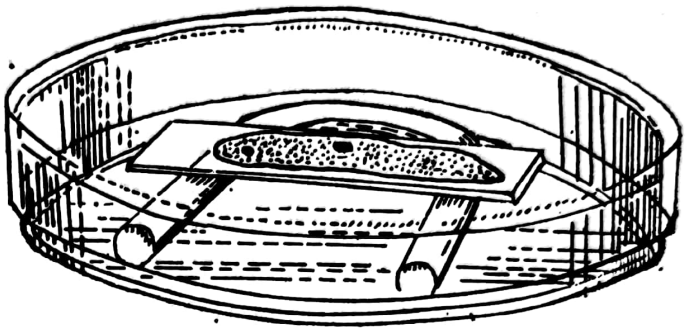


*Fig. 113.* — Cultura pe lamă. Metoda Rivalier și Seydel, modificată (după Segretain, Drouhet și Mariat).

Ulterior metoda a fost simplificată în sensul că nu se mai cufunda lama în mediul topit. Lama se așeza pe un suport într-o cutie Petri și cu o pipetă Pasteur se acoperea fața ei superioară cu mediul gelozat topit. După care, cu aceeași pipetă se sustrăgea excesul de mediu, pentru ca pătura de geloză să rămînă cît mai subțire. Fața acoperită cu mediu, după răcirea acestuia, se însămînța și restul decurgea ca mai sus (fig. 113).

M. Langeron a propus o altă metodă. El utiliza în loc de cutii Petri, cilindre Borrel. Într-un cilindru Borrel introducea întîi o prismă triunghiulară de sticlă, pe fețele căreia urmau să se sprijine trei lame de microscopie.

Cilindrul Borrel era menținut culcat, fixat de masa laboratorului printr-un bloc de plastilină. Se ridica cu o mînă capacul cilindrului, iar cu cealaltă, cu ajutorul unei piepete cudate la vîrf, se introducea la capătul uneia din lame (care era menținută în poziție orizontală) o picătură de mediu topit. Picătura era imediat întinsă pe toată această suprafață a lamei cu aceeași pipetă (sau cu o alta cudată la capăt, sub forma unui triunghi). Prin întoarcerea cilindrului Borrel cu cîte o treime de tur, celelalte lame erau aduse în poziție orizontală și gelozate la fel.

Inspirîndu-se de la această metodă, în care lamele erau protejate de un cilindru Borrel menținut orizontal, V. Nitzulescu folosește un dispozitiv extrem de simplu, destinat a menține cilindrul Borrel mult mai sus față de masa de lucru, ceea ce ușu-



Scanned with OKEN Scanner

rează manopera gelozării lamelor. Dispozitivul constă din o tijă de fier înaltă de circa 35 cm, care susține o talpă îngustă, pe care sînt sudate 2 cercuri de sîrmă deschise la partea lor superioară, alcătuind astfel un lăcaș pentru cilindrul Borrel. Tija se poate și flexa pe un ax cu șurub situat al mijlocul ei, ceea ce îi permite o înclinare a porțiunii sale superioare și inclusiv o modificare a poziției orizontale a cilindrului Borrel — după caz (fig. 114).

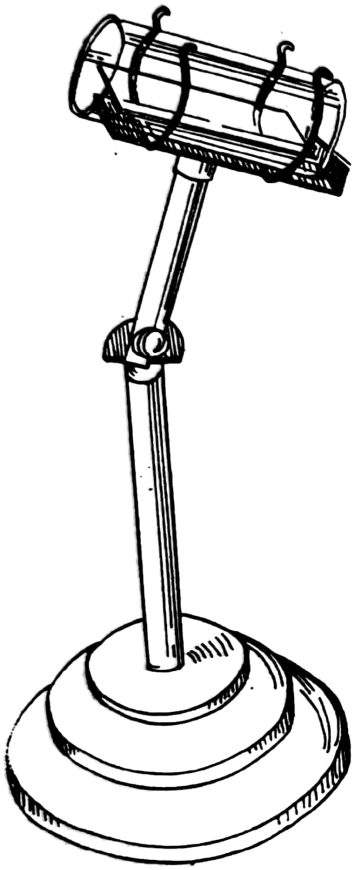


*Fig. 114.* — **Dispozitivul introdus de V. Nitzulescu pentru cultura pe lamă.**

În cilindrul Borrel e suprimată prisma de sticlă și sînt introduse în loc de 3 lame de sticlă, numai 2 lame, una peste alta, pentru a se crea un spațiu liber mai mare necesar pentru confecționarea, în bune condiții, a frotiului și a însămînțării consecutive. Întoarcerea cilindrului Borrel pentru gelozarea ambelor lame e foarte ușoară. Ea se face retrăgînd cilindrul din lăcașul său și întorcîndu-l brusc în mînă, după care se așază din nou la loc, dar cu lama cea nouă în sus. Cum cilindrul Borrel se află la oarecare înălțime față de masa de lucru (35 cm), pe această masă, dedesubtul locului unde vine capacul cilindrului, poate arde o lampă cu spirt, care nu va permite microbilor din aer să pătrundă în Borrel, atunci cînd se scoate capacul acestuia pentru gelozare și însămînțare. Mediul gelozat e întins pe lamă în felul în care se întinde un frotiu de sînge. Frotiul îl facem cu o langhetă subțire de oțel, fixată într-un mîner de material plastic. Această langhetă e bine trecută prin flacără imediat înainte de a fi utilizată pentru frotiu, ceea ce reprezintă un dublu avantaj. Întîi acela că mărește precauțiile de sterilitate și al doilea că, fiind încălzită, nu permite închegarea imediată și îngroșarea picăturii de mediu gelozat topit înainte de a fi fost tras frotiul.

Însămînțarea lamelor din cilindrul Borrel o facem la fel cum o făcea pe vremuri M. Langeron, prin două striuri paralele trase în lungul cilindrului cu o pipetă Pasteur, închisă la capăt — pipetă care a fost muiată într-o eprubetă în care se găsea, în 10 ml apă distilată o diluție foarte mare a fungului de însămînțat. În



Scanned with OKEN Scanner

cazul în care e vorba de căutarea de asce (problemă asupra căreia vom reveni mai jos), concentrarea diluției poate fi mai mare, întrucît necesită o creștere cît mai abundentă, care să epuizeze repede substanța hrănitoare din mediul de pe lamă. După însămînțare cilindrele Borrel se pun pe masă vertical și pe fundul lor se pune puțină apă distilată, în care am introdus cîteva picături de acid clorhidric.

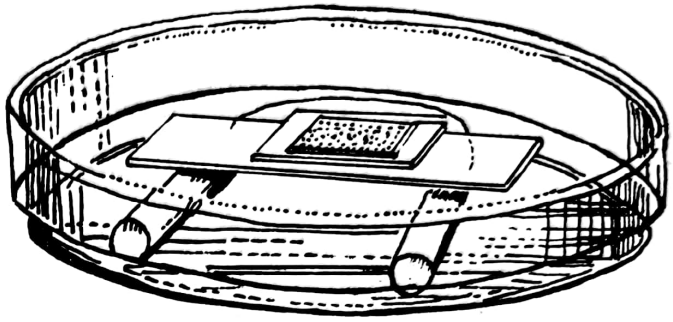


*Fig. 115.* — Cultura pe lamă. Metoda pătratului de geloză (după Segretain, Drouhet și Mariat).

O altă metodă de cultură pe lamă e aceea a pătratului de geloză recomandată de profesorul Drouhet, de la Institutul Pasteur din Paris. În această metodă, pe o lamă sterilizată se pune un pătrat de geloză cu o grosime de 2—3 mm, a căror laturi nu trebuie să depășească pe acelea ale unei lamele. Pătratul de geloză se însămînțează pe muchiile sale și se acoperă apoi cu o lamelă sterilizată. Fungul se va dezvolta atît pe sticla lamei, cît și pe aceea a lamelei, trăgîndu-și hrana din geloza din pătrat. Este ceea ce s-ar putea numi creștere pe sticla goală *(sur verre sec)*. După ce cultura s-a dezvoltat, se ridică lamela, se ridică și se aruncă pătratul de geloză și se vor colora, atît lama cît și lamela pe care se găsesc întinse filamentele și sporii fungului (fig. 115).

**Cultura pe lamelă gelozată.** Se practică în felul culturii în picătură suspendată, față de care este superioară. Se lipește la fel, cu lanolină, un inel de sticlă pe o lamă de microscopie. Se gelozează pe o față o lamelă sterilizată, ținută orizontal, cu unul din colțuri înfipt într-un bloc de plastilină. Gelozarea se face turnînd cu o pipetă o picătură de mediu gelozat topit. Geloza, după ce s-a răcit, se însămînțează cu 2 strie paralele (sau se pune cu o ansă cantitatea mică de cultură pe mijlocul ei).

Se unge cu lanolină sterilă marginea superioară a inelului de sticlă. Se pune pe fundul spațiului demarcat de verighetă puțină apă distilată. Se apucă lamela cu o pensă sterilă și se aplică cu fața însămînțată în jos, pe marginea superioară a inelului.

Acest procedeu are marele avantaj de a putea examina cultura în dezvoltare cu un obiectiv chiar puternic al microscopului, în tot cursul dezvoltării ei.



Scanned with OKEN Scanner

Langeron şi Vanbreuseghen au cerut construirea de inele de sticlă ovalare, măsurînd 3 cm pe 2 cm, care să le permită a folosi pentru această metodă lamele mai lungi.

**Colorarea culturilor pe lamă.** Putem utiliza două feluri de coloraţii :

1. o coloraţie de scurtă durată cu albastru-coton în lactofenol ; deşi lamela va fi înconjurată de un lac, totuşi preparaţia nu va dura decît cîteva luni ;

2. o coloraţie durabilă montată în balsam de Canada.

**Coloraţia extemporanee în lactofenol.** Cel mai bun colorant este albastru-coton C. 4. B. al lui Poirrier. Formula colorantului va fi :

1. Se prepară lactofenolul Aman :

| | |
|---|---|
| Fenol cristalizat (cristale albe) . . | 10 g |
| Acid lactic . . . . . | 10 g |
| Glicerină . . . . . | 20 g |
| Apă distilată . . . . . | 10 g |

Cantităţile sînt în greutate, nu în volum. Fenolul se adaugă la urmă. Dacă este roşu (sub acţiunea luminii) trebuie în prealabil decolorat. Pentru aceasta M. Langeron recomandă să i se adauge imediat după topire 3 g de lînă la litru, sau după topire să i se adauge 12% alcool de 95°. Se lasă să recristalizeze. După răcire cristalii vor fi albi.

2. Se pune la fiert lactofenolul, după adăugarea unei cantităţi în exces de Sudan III. După o foarte scurtă fierbere se lasă să se răcească şi se filtrează. Lactofenolul a încorporat la saturaţie Sudanul. Aceasta va colora lipidele din fung.

3. Se adaugă la 100 ml lactofenol saturat cu Sudan III, 0,5 g albastru coton C.4.B.

4. Colorantul se păstrează într-o sticlă colorată, bine închisă.

**Coloraţia fungului.** Se pun lamele pe o etajeră de sîrmă sau la etuvă, pentru a se usca bine (partea lor inferioară în metoda cilindrului Borrel e umedă). Se introduc apoi într-un cilindru Borrel plin cu xilol fenicat (xilol 4/5, fenol 1/5, deci fenol 20% în xilol).

După cîteva minute de şedere în xilol fenicat se trec în al doilea Borrel cu alcool 95°, unde rămîn, de asemenea, cîteva minute.

Apoi se vor pune pe etajera de sîrmă, se va turna pe ele încă puţin alcool 95° (cîteva picături), căruia i se dă foc. După ce flacăra se stinge, se pune o picătură de albastru-coton pe lamă, o alta pe o lamelă curăţită bine şi se îmbină ambele picături, aşezînd lamela pe lamă. Bineînţeles că mărimea picăturilor va fi



Scanned with OKEN Scanner

fost socotită în așa fel ca lichidul să nu debordeze de marginile lamelei.

Cum însămînțarea a fost făcută în striuri longitudinale, deci pe toată întinderea lamei, se pot pune 2 lamele pe aceeași lamă.

Lamelele vor fi încercuite ziua următoare cu lac de unghii.

**Colorații durabile.** Coloratia cu albastru-coton acetic.

Se prepară după formula :

| | | |
|---|---|---|
| Apă distilată . . . . . | 100 | ml |
| Albastru-coton C.4.B. . . . | 0,5 | g |
| Acid acetic cristalizabil . . . | 3 | ml |

M. Langeron recomandă procedeul de colorare următor :

— se usucă lama, de preferință la 37°C ;

— se fixează cu alcool 95° — pe care îl așteptăm să se evapore ;

— se acoperă lama bine uscată cu colorantul ; se colorează 10 min. ;

— se spală cu apă de robinet, se deshidratează și se montează în balsam de Canada.

**Coloratia biacidă a lui Mann.** Se prepară colorantul complex :

| | |
|---|---|
| Sol. 1% de albastru de metil în apă distilată . . . . | 35 ml |
| Sol. 1% de eozină în apă distilată . . . . . | 45 ml |
| Apă distilată . . . . . | 100 ml |

Se utilizează de preferință eozina W. G. Grübler. Tehnica de colorare recomandată de Dobell e următoarea (în M. Langeron) :

— se colorează cultura bine uscată și fixată ca mai sus — prin menținerea, timp de 12 ore (o noapte), în soluție biacidă ;

— se spală repede cu apă de la robinet ;

— se diferențiază pe lamă cu o soluție slabă de oranj G, în alcool 70°. Se va obține o culoare violacee. Se deshidratează trecînd direct la alcool absolut, apoi xilol și balsam de Canada.

**Colorarea cu eritrozină.** Un bun colorant pentru culturile pe lamă îl constituie și eritrozina, în soluție 1%. Se poate pune și eritrozină 1% fenicată, adică dizolvată 1% în apă fenicată 5%. Se colorează timp de 10 min. și se trece direct la spălarea foarte rapidă cu alcool 95° (se evită deci spălarea cu apă), apoi alcool absolut, xilol și balsam de Canada.

**Colodionarea.** Cînd legăturile dintre spori și filamente sînt foarte delicate și ne este frică să nu se deranjeze în cursul manipulărilor numeroase cerute de spălare și deshidratare pentru



Scanned with OKEN Scanner

montarea în balsam de Canada, putem face o prealabilă colodionare a lamei care va fi supusă la colorație. Se face o diluare a colodiului oficinal (fără ulei de ricin), cu un amestec în părți egale de alcool absolut și eter sulfuric :

| | |
|---|---|
| Colodiu oficial . . . . | 1 ml |
| Alcool absolut . . . | 2 ml |
| Eter sulfuric . . . . | 2 ml |

— se pune soluția cu o pipetă deasupra preparației bine uscate în prealabil ;

— se scurge excesul de lichid și se lasă din nou să se usuce pe un suport. Lama rămîne în poziția orizontală cu fața colodionată în sus, dar la adăpost de praf sau alte impurități. După uscare se poate colora. Colorantul pătrunde ușor prin pătura de colodiu.

**Identificarea fungilor din genul Candida** întîlniți în examenul coproparazitologic.

Fungii aparținînd genului *Candida* trebuie să întrunească următoarele însușiri :

— să producă blastopori (deci să fie blastoporați), dar să nu producă, în același timp, și asce cu ascospori (deci să fie anascosporați) ;

— să fie capabili a produce și filamente, care vor fi în realitate pseudofilamente (pseudomicelii).

Primul lucru pe care trebuie să-l facem atunci cînd întîlnim la examenul cu lugol elemente blastoporate este de a le izola din materii și a le obține în cultură pură.

Pentru aceasta vom însămînța materiile fecale pe un mediu favorabil dezvoltării fungilor. Mediul cel mai potrivit este mediul Sabouraud gelozat și glucozat 2%. Pentru a evita pe cît posibil creșterea pe mediu a nenumăraților microbi din materiile fecale este de dorit ca mediul să conțină 0,5 g‰ cloramfenicol. Unii autori recomandă să se adauge, pentru o bună izolare, și actidionă, tot 0,5 g‰. Actidiona are însă dezavantajul de a împiedica și creșterea unor specii ale genului *Candida* și a încetini creșterea tuturor fungilor. Ea are avantajul de a suprima creșterea unor contaminanți constituiți de fungi fialidee *(Aspergilus, Penicilium)*. Se pot face două încercări de izolare, în paralel : una cu actidionă și alta fără actidionă. În amîndouă va exista însă cloramfenicolul.

Noi procedăm astfel : introducem ansa bacteriologică (sterilizată) în mai multe puncte ale materiilor fecale și facem o strie groasă



Scanned with OKEN Scanner

pe geloză. Se lasă tubul la temperatura camerei şi se urmăreşte zi de zi ceea ce se dezvoltă la suprafaţa gelozei.

În general, chiar de a 2-a zi, dar mai sigur după 48 de ore, se pot distinge net colonii, fie de *Candida*, fie de *Geotrichum*. Ele se reînsămînţează cu grijă pe un nou tub cu Sabouraud, cu un fir bacteriologic fin, îndoit la capăt în unghi drept.

Examenul direct şi sumar la microscop al coloniei crescute ne va arăta dacă e vorba de un fung blastosporat (probabil *Candida*) sau artrosporat (probabil *Geotrichum*).

De cele mai multe ori e vorba de fungi blastosporaţi. Se văd la microscop celule ovalare sau rotunde, purtînd unul sau mai mai mulţi blastospori.

Pentru a ne asigura că intră în genul *Candida*, trebuie să verificăm dacă :

— face sau nu ascospori (genul *Candida* e anascosporat) ;

— face sau nu filamente (fungii genului *Candida* produc filamente *(pseudomicelium)*.

## Producerea de asce

Chiar şi fungii ascosporaţi nu fac asce în tot timpul. Fungul trebuie silit să producă asce. Pentru aceasta trebuie însămînţat pe medii sărace. Unul din mediile recomandate e acela al lui Gorodkowa, în care glucoza e numai 1‰. Un alt mediu favorabil producerii de asce a mediului lichid al lui De Almeida şi Da Silva Lacaze. Are formula :

| | |
|---|---|
| Amidon de cartofi . . . | 5 g |
| Apă distilată . . . . . | 1 000 ml |

Se repartizează în tuburi şi se sterilizează la 120°C 20 de min. Cultura se păstrează la 37°C.

S-a mai recomandat însămînţarea pe felii de morcov. Se taie o bucată de morcov în formă de prismă şi se introduce într-o eprubetă, care posedă la partea inferioară o gîtuitură. Prisma de morcov se reazimă pe această gîtuitură. Se pune apă în porţiunea inferioară a eprubetei. Nivelul apei depăşeşte gîtuitura şi încă 1 cm peste partea inferioară a prismei de morcov. Se sterilizează



Scanned with OKEN Scanner

de 2 ori în zile consecutive — cîte 30 min., la 120°C, la autoclav. Se însămînţează în strie, pe feţele prismei (fig. 116).

Şi cu această metodă, ca şi cu aceea precedentă, trebuie aşteptat cel puţin 3 săptămîni, observînd din cînd în cînd, prin luare de probe din cultură şi colorarea lor, dacă s-au produs sau nu asce.

M. Langeron recomandă pentru producerea de asce însămînţarea fungului pe lamă. Însămînţarea poate fi mai bogată. Fungul epuizează repede substanţele hrănitoare din mediu şi dacă este ascosporat produce asce. Dar şi prin cultivarea pe lamă trebuie să aşteptăm 3 săptămîni înainte de a ne putea pronunţa.

## Producerea de filamente

Cea mai rapidă şi mai practică metodă pentru silirea fungului să filamenteze este cultivarea pe plăci Petri după procedeul „Dalmau plates" al autorilor olandezi.

Se întinde pe fundul unei cutii Petri o pătură foarte subţire de mediu. Mediul cel mai recomandat este mediul cu orez, mediul P.C.B., mediul Gorodkowa.

Se face o însămînţare în strie scurtă (care să depăşească cu puţin lungimea unei lamele) şi se acoperă mijlocul striei cu o lamelă sterilizată. Se produce sub lamelă un mediu foarte sărac în oxigen. Pe acelaşi Petri, se pot însămînţa deodată 3—4 fungi necunoscuţi (fig. 117).

Se priveşte la microscop cultura crescută la 48 de ore. Dacă ridicăm capacul Petri-ului putem utiliza pentru observarea culturii şi obiective puternice. În general, chiar la 48 de ore se pot observa filamente bine dezvoltate, atît sub lamelă, cît şi în afara ei.

**Purificarea tulpinii.** Să presupunem că avem o tulpină ale cărei caractere corespund cu acelea ale genului *Candida*. E o tulpină blastosporată, anascosporată şi filamentoasă. Pentru a adînci mai departe identificarea trebuie să precizăm cărei specii a genului *Candida* aparţine. Pentru aceasta trebuie să o supunem la probe biochimice, dar înainte de a executa aceste probe este absolut necesar ca să debarasăm de microbi tulpina respectivă. Altminteri microbii existenţi ar putea să participe în oarecare măsură la probele biochimice şi să falsifice astfel rezultatele. Cel mai bun mijloc de purificare de microbi a unei tulpini de fungi e



Scanned with OKEN Scanner

însămînţarea ei pe mediul Raulin, mediu acid şi impropriu pentru dezvoltarea microbilor.

Tulpina trebuie însămînţată într-un tub cu mediu Raulin. După 3 zile ea va fi trecută în al doilea tub cu mediu Raulin (Raulin II) şi, după alte 3 zile, într-un al treilea tub asemănător (Raulin III).

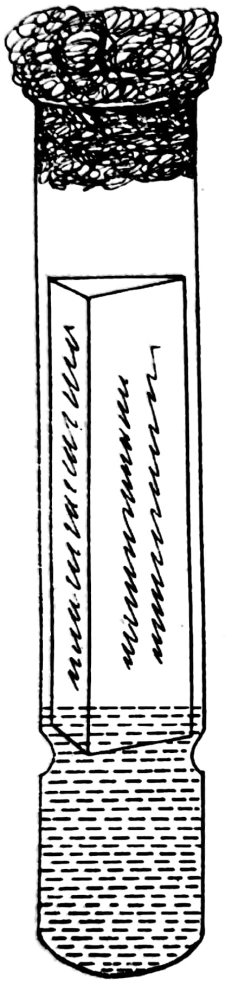


*Fig. 116.* — Bucăţi prismatice de morcov pentru însămînţarea fungilor.

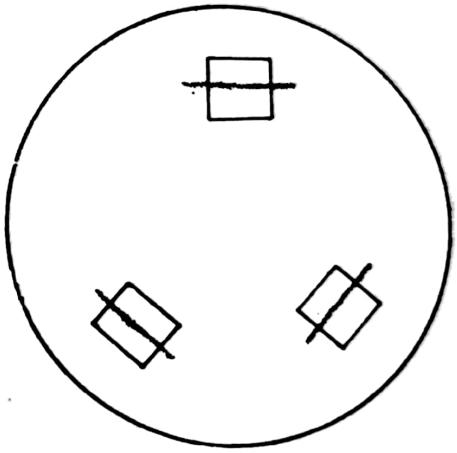


*Fig. 117.* — Însămînţarea pe plăci Petri pentru filamentizare. Pe aceeaşi placă pot fi însămînţate mai multe tulpini.

Cultura care se formează în tubul Raulin III se poate trata în două moduri :

1. Se poate sustrage din această cultură o foarte mică porţiune, cu o pipetă Pasteur, şi se trece în 10 ml de apă distilată sterilizată. Se amestecă bine prin învîrtirea tubului între palme. Se ia o mică porţiune din acest lichid cu o ansă bacteriologică şi se însămînţează pe o placă Petri cu mediu Sabouraud, cu cloramfenicol, într-o strie lungă, pînă la epuizarea lichidului cules pe ansă.

2. Se pune cca 1 ml din diluţia făcută în apă distilată, la mijlocul unei raze a plăcii Petri. Cu o pipetă Pasteur, închisă la capăt şi cudată în unghi drept, al cărei punct de cudură se aşază în



Scanned with OKEN Scanner

centrul Petri-ului, se execută o mişcare circulară a pipetei, care să întindă circular lichidul depus.

Vom urmări placa Petri pe care chiar de a doua zi încep să apară colonii de fungi. Vom lua dintre acestea pe cele mai mici, cu un fir de nichel-crom cudat la capăt în unghi drept, şi vom executa o strie în zigzag, pe un tub cu Sabouraud gelozat conţinînd cloramfenicol.

În loc de lichid Raulin, pentru a debarasa de microbi o tulpină de fungi, Pijper utiliza un bulion foarte acid, adus la pH = 2 prin acid clorhidric decinormal. Vanbreuseghem recomandă mediul Sabouraud lichid acidificat. La 5 ml de Sabouraud lichid, 3 picături de acid clorhidric normal dau un pH = 3,1, iar 6 picături, un pH = 2. Vanbreuseghem a obţinut cu acest mediu rezultate la fel de bune ca şi lichidul Raulin.

Vom obţine astfel tulpina debarasată de microbi, iar în cazul în care colonia în care noi credeam că e numai o singură tulpină se aflau în realitate reunite două tulpini de specii deosebite, avem şansa să obţinem numai una dintre ele, care prin creştere mai rapidă a apărut în mica colonie de după 24 de ore. Cu această tulpină purificată vom urmări în continuare reacţiile biochimice în vederea determinării speciei. Şi aspectul coloniilor izolate în aceste condiţii ne poate ajuta în determinarea diferitelor specii.

## Zimograma

Fiecare specie a genului *Candida* are anumite capacităţi de fermentare a diverselor zaharuri care sînt testate. Se testează, de obicei — dintre hexoze — glucoza şi galactoza, dintre diholoside — maltoza, zaharoza şi lactoza şi dintre triholoside — rafinoza.

De fapt levurile fac să fermenteze numai hexozele. Faţă de diholozide şi triholozide ele intervin întîi cu o osidază care depolimerizează molecula lor complexă şi o reduc în compuşi, în care intră una sau mai multe hexoze. Or, tocmai prin aceste osidaze se diferenţiază între ele diferitele specii de levuri (M. Langeron).

Prin posesia uneia sau alteia dintre ele, pot fi atacate moleculele diverselor diholozide sau triholozide. De aceea Langeron se opune expresiei : „cutare levură face să fermenteze maltoza sau lactoza". În realitate această levură posedă maltază sau lactază, prin care depolimerizează molecula de diholozid şi o reduce în



Scanned with OKEN Scanner

una sau mai multe hexoze. Spre exemplu, maltaza transformă maltoza în două molecule de glucoză, lactaza transformă lactoza într-o moleculă de glucoză și una de galactoză.

Există unele levuri care nu posedă zimază și, în consecință, ele nu pot face să fermenteze nici un zahar. Ele sînt *azimatice.*

Altele sînt *zimatice* — adică posedă acea zimază (nespecifică) care face să fermenteze o hexoză.

Pe baza celor de mai sus M. Langeron prezintă următorul tablou de fermentație a levurilor :

A. *Levuri azimatice* : nu fac să fermenteze nici un zahar.

B. *Levuri zimatice.* Posedă zimază și fac să fermenteze hexozele.

1. Levuri zimatice simple : neposedînd osidaze, nu pot depolimeriza zaharurile complexe. Ele nu pot ataca decît hexozele = grupa *krusei* și *brumpti.*

2. Levuri zimazo-osidazice : posedă în plus și osidaze (hidrolaze specifice) :

a) levuri maltazice : dedublează maltoza în două molecule de glucoză = grupul *albicans ;*

b) levuri zaharice : dedublează zaharoza în glucoză și fructoză = *Candida guillermondi* și *C. parapsilosis ;*

c) levuri maltozaharice : pot dedubla atît maltoza, cît și zaharoza = grupul *tropicalis ;*

d) levuri zaharolactazice : dedublează zaharoza și lactoza = grupul *pseudotropicalis* (M. Langeron).

Există cu privire la fermentația zaharurilor 3 legi, numite legile lui Kluyver-Dekker, pe care trebuie să le avem tot timpul în minte. Acestea sînt :

1. Orice levură care nu fermentează glucoza nu poate fermenta nici un alt zahar.

Firește : dacă nu poate fermenta glucoza, înseamnă că nu posedă zimază, e azimatică.

2. Orice levură care fermentează glucoza, fermentează, de asemenea și fructoza și manoza. Asta înseamnă că proba fermentării acestor două din urmă zaharuri e inutilă și nu trebuie făcută.

3. Nici o levură nu face să fermenteze, în același timp, maltoza și lactoza.

Această din urmă lege, verificată printr-o foarte largă experiență a numeroși autori, este de o deosebită importanță pentru că ne atrage atenția asupra unor eventuale greșeli ce s-au putut strecura în experimentul nostru. Dacă obținem în același timp fermentarea și a maltozei, și a lactozei, este foarte probabil că avem de-a face cu o impurificare. Fie că e vorba de microbi care



Scanned with OKEN Scanner

continuă să se dezvolte împreună cu fungul, fie că e vorba de o impurificare cu un alt fung şi trebuie să facem efortul de a-i separa. În orice caz, cultura cu care am lucrat nu a fost pură (M. Langeron).

M. Langeron era de părere că probele de fermentaţie trebuie făcute numai cu următoarele cinci zaharuri : glucoza, zaharoza, maltoza, lactoza şi rafinoza. Nitzulescu, în 1942, a insistat asupra valorii inulinei, polizaharid care, prin hidroliză se transformă în fructoză. Inulina nu este spontan hidrolizabilă, cum au considerat-o Langeron şi Guerra şi fermentaţia ei poate caracteriza unele specii de *Candida*, cum e *C. Pseudotropicalis*. Acelaşi autor a arătat, de asemenea, valoarea amigdalinei pentru caracterizarea prin proba de fermentaţie a aceluiaşi fung — *C. pseudotropicalis*. Amigdalina e total hidrolizată de fermenţii acestui fung, degradarea ei mergînd pînă la acidul cianhidric. Alţi autori (Van Udden) adaugă un nou zahar capabil a da rezultate concludente pentru determinarea unor specii de *Candida* şi anume *trehaloza*.

Există mai multe metode pentru realizarea probei de fermentaţie. Vom expune întîi metoda Langeron şi Guerra, pe care o considerăm ca cea mai bună.

**Metoda Langeron-Guerra.** Se utilizează eprubete mici, 12 × 12. Se prepară soluţiile de zahăr după formula :

| | |
|---|---|
| Peptonă . . . . . | 1 g |
| Zahărul de testat . . . . | 2 g |
| Apă distilată . . . . . | 100 ml |

Soluţia se repartizează în tuburi, fiecare tub fiind umplut pe jumătate.

Lichidul fermentescibil se acoperă cu un dop de parafină moale, preparată după formula :

| | | |
|---|---|---|
| Parafină de incluzie la 55°C . . . | 2 părţi | în greutate |
| Ulei de parafină . . . . . | 1 parte | |

Din acest mediu topit la căldură se pune cu o pipetă atîta cît să formeze un strat de 3 mm. La răcire parafina se solidifică şi constituie un dop de această grosime, care ocluzionează ermetic soluţia.

Sterilizarea tuburilor garnisite cu dopul de parafină se face prin autoclavare cu autoclavul deschis, trei zile în şir, cîte o oră.

Pentru însămînţare se încălzeşte întîi regiunea dopului de parafină, printr-o învîrtire foarte rapidă într-o flacără mică (flacăra de veghe a unui bec de gaz). Apoi cu un fir gros de nichelcrom, îndoit la un capăt în unghi drept, se împinge într-o latură



Scanned with OKEN Scanner

dopul, silindu-l să basculeze și să capete o poziție verticală, și se trage dopul în sus, cu cîrligul format de cudura în unghi drept a firului de nichel-crom. Însămînțarea se face pe lîngă dop. Se retopește apoi dopul de parafină la aceeași flacără foarte mică și se lasă tubul în poziție verticală. Parafina se întărește și ocluzionează mediul însămînțat.

Bulele de gaz — în cazul unei eventuale fermentații — ridică dopul în sus, la o înălțime în raport cu cantitatea gazului format. Gazul poate începe să se producă chiar a 2-a zi. Dar fermentația e mai intensă în ziua a 3-a sau a 4-a. Există și specii care fermentează mai slab și mai tardiv. De aceea trebuie să așteptăm 20 de zile. Dacă în curs de 20 de zile nu se produce gaz sub dop putem conchide că acea specie nu fermentează zaharul respectiv. Bulele mici de gaz apărute peste 20 de zile pot fi interpretate ca datorate nu fungului însămînțat, ci unor microbi care între timp au reușit să se dezvolte în mediu (fig. 118).

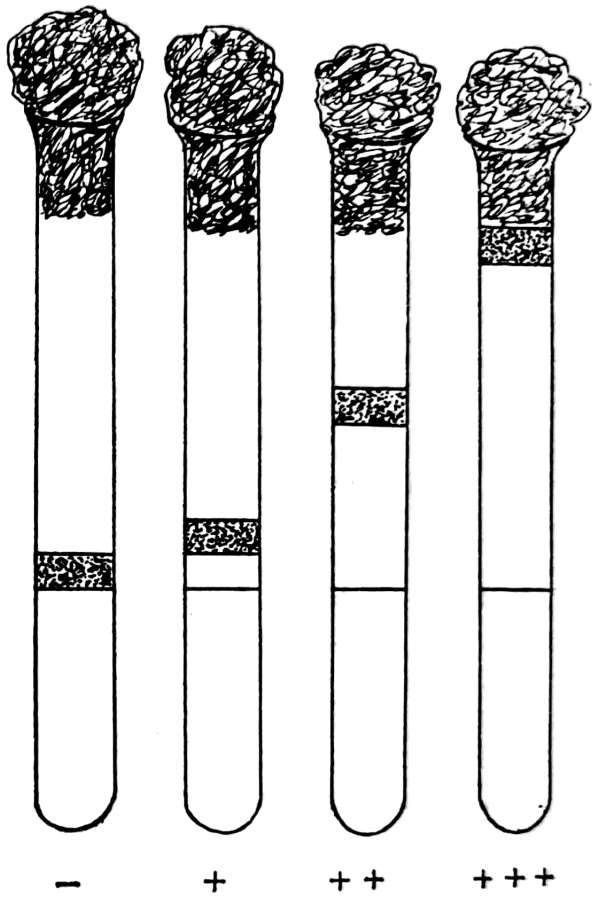



*Fig. 118.* — Metoda Langeron-Guerra pentru testarea puterii fermentative a fungilor. Dopul de parafină e ridicat la niveluri diferite, în raport cu cantitatea gazului dezvoltat.

*Contraprobă.* La tuburile care nu au fermentat, pentru a ne convinge că într-adevăr e vorba de o fermentare negativă, vom sustrage cu o pipetă Pasteur sterilă cîteva picături din fundul lor și le vom însămînța pe un mediu Sabouraud proaspăt. Dacă fungul există și nu a fost omorît în cursul manipulației de însămînțare, el se va dezvolta pe noul mediu.

**Acidificarea mediului de cultură.** Unii fungi sînt incapabili de a produce gaz în mediul de cultură, dar produc o acidificare a mediului, constatabilă prin indicatori de pH. În metoda Langeron și Guerra, mai sus expusă, nu se face apel la nici un astfel de indicator, întrucît acești autori sînt de părere că acidificarea

mediului nu este un caracter valabil, ci iluzoriu, pentru determinarea levurilor şi, în special, pentru determinarea speciilor genului *Candida*. Alţi autori însă, cu alte metode de fermentaţie pe care le vom expune mai jos, consideră caracterul ca valabil şi demn de reţinut şi notează levura respectivă în cazurile pozitive pentru fiecare zahar testat cu A (acidificare) şi cu G (producere de gaz).

**Fermentaţia în geloză moale.** Metoda Marcelou-Kinti şi Vournous. Această metodă, adoptată de Institutul Pasteur din Paris, constă în gelozarea mediului fermentescibil în proporţie de 6‰. În mod practic se procedează astfel : se introduce întîi în tuburile de fermentaţie mediul, alcătuit din apă distilată peptonată 1% şi gelozată 6‰, căruia i se adaugă şi un indicator de pH. Acesta e indicatorul Andrade. Se prepară astfel :

| | |
|---|---|
| Fuxină acidă . . . . . | 0,5 g |
| Apă distilată . . . . . | 100 ml |

Se alcalinizează pînă la decolorare cu hidroxid de sodiu în soluţie normală (cca 17 ml). E incolor la pH = 7,2. Se introduce în mediu în proporţie de 1%. Se înroşeşte la scăderea pH-ului. Se sterilizează la autoclav 20 de min. la 120°C. În momentul reacţiei se topeşte mediul gelozat şi i se adaugă zaharul respectiv, care se găseşte sterilizat în soluţie 20%, în fiole. Se va adăuga în fiecare tub atîta soluţie din zaharul pe care vrem să-l testăm pînă se ajunge la o concentraţie finală de zahar de 2%. Dacă, spre exemplu, se găseau în eprubete 9 ml apă distilată peptonată şi gelozată 6‰, se vor adăuga 20 de picături din soluţia zaharată 20%. Se amestecă bine lichidul peptonat cu soluţia de zahăr şi se lasă să se răcească, menţinînd tubul în poziţie verticală, pentru a se prinde geloza. Însămînţarea se face prin înţepare profundă, pînă aproape de fundul tubului.

Acidificarea determină înroşirea mediului. Producerea de gaz se recunoaşte prin crăpături mari, care se produc în masa de geloză moale. Rezultatele se obţin în 48 de ore, dar cantitatea de gaz produsă se apreciază mai bine cu metoda Langeron-Guerra.

M. Quilici (1968) recomandă ca şi în această metodă să se pună deasupra mediului dopuri de parafină după însămînţare, pentru a se aprecia cantitatea gazului produs. Cînd reacţia e pozitivă, parafina se separă net de geloză.

Mai recent, J. Despeignes şi N. R. Battesti au propus o a treia metodă de fermentare, care ar putea da rezultate valabile, chiar la 24 de ore.



Scanned with OKEN Scanner

**Metoda Despeignes şi Battesti.** Se foloseşte tot o geloză moale, dar 9‰. Ca indicator de pH se foloseşte bromcrezol-purpur. Formula mediului e următoarea :

| | | |
|---|---|---|
| Geloză | 9 | g |
| Peptonă | 10 | g |
| Bromcrezol-purpur | 0,04 | g |
| Cloramfenicol | 0,5 | g |
| Apă de robinet | 1 000 | ml |

Se moaie în ajun geloza în 900 ml apă. Se topeşte prin fierbere, după ce am adăugat şi peptona. Se adaugă în materialul topit colorantul (bromcrezol-purpur) şi cloramfenicol, topite în 100 ml apă.

Se repartizează în tuburi şi se sterilizează 20 de min., la 115°C.

Se iau, pe de altă parte, discuri mici de hîrtie de filtru, care se impregnează cu cîte 3 picături din soluţia 30% din fiecare zahar de testat. Se usucă discurile impregnate, se stochează în tuburi şi se sterilizează prin tindalizare.

Discurile impregnate se repartizează în tuburi de hemoliză sterile. Se îmbibă fiecare disc cu 4—5 picături dintr-o emulsie a levurii de testat, emulsie obţinută diluînd cu ser fiziologic totalitatea unei culturi de 48 de ore pe un tub de mediu Sabouraud 2%.

Se topeşte mediul cu peptonă şi geloză arătat mai sus şi se toarnă cîte 2 ml în fiecare din tuburile de hemoliză, peste discurile impregnate cu soluţia de zahar şi cu emulsia de levură.

Se citeşte rezultatul peste 24 de ore. În caz de rezultat îndoielnic, se aşteaptă încă 24 de ore. Indicatorul virează spre galben, în caz de acidificare.

Prin această metodă reacţia se concentrează în fundul tubului — acolo unde se găseşte discul de hîrtie. Se poate obţine o singură bulă de gaz în contact cu acest disc. Teoretic metoda este pe cît de simplă, pe atît de practică. În fapt însă noi nu am obţinut rezultate care să ne convingă să-i dăm preferinţă şi continuăm a recomanda metoda Langeron-Guerra pentru determinarea capacităţii fermentative a fungilor.

## Auxanograma

**Asimilarea zaharurilor** (numită încă de M. Langeron „elecţia zaharurilor"). Unii fungi sînt capabili să folosească pentru nutriţia şi dezvoltarea lor unele zaharuri şi incapabili să folosească altele. Această însuşire poate să fie folosită pentru determinarea



Scanned with OKEN Scanner

unor specii ale genului *Candida*. Asimilarea zaharurilor se evidenţiază prin metoda auxanografică a lui Beijerinck.

În *metoda auxanografică* se face o însămînţare în masă a fungului cercetat, într-un mediu gelozat, pus pe fundul unei cutii Petri. Mediul conţine prea puţine substanţe hrănitoare şi nu reprezintă prin el însuşi un bun mediu de creştere. Dacă noi punem la suprafaţa mediului diverse zaharuri, care se topesc şi difuzează la suprafaţa lui, fungul se dezvoltă bine în regiunea în care a difuzat numai acel zahar pe care este capabil să-l asimileze. Vom recunoaşte creşterea fungului prin opacitatea care se produce în acea regiune şi care are o formă circulară, dacă zaharul respectiv a fost pus în mijlocul Petri-ului, sau semicirculară, dacă a fost pus aproape de marginea lui.

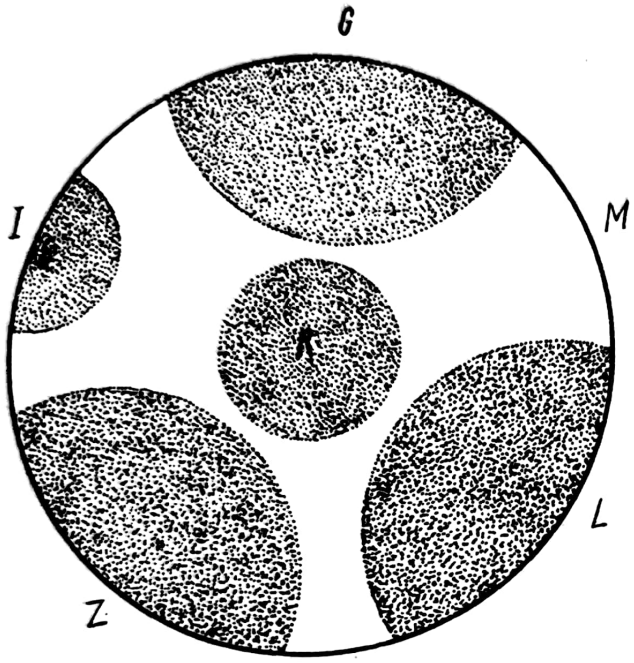



*Fig. 119.* — Metoda auxanografică. În dreptul substanţelor asimilate se formează un semicerc de creştere a fungului respectiv : *G* — glucoza, *M* — maltoza, *L* — lactoza, *Z* — zaharoza, *R* — rafinoza, *I* — inulina. Rezultatele în exemplul dat se referă la *Candida pseudotropicalis*.

Există mai multe maniere de a proceda pentru executarea unei auxanograme. Iată cum se procedează în laboratorul nostru :

1. Se aleg cutii Petri cu un diametru de 8—10 cm, cu fundul plat, din sticlă foarte transparentă, de bună calitate. Ele se sterilizează la pupinel.

2. Se face o emulsie bogată din fungul de cercetat, în 3—4 ml apă distilată sterilă. Emulsia se realizează cu grijă, pe peretele eprubetei respective, în aşa fel ca să nu conţină grunjuri de aglomeraţii de fungi, ci să fie omogenă.

3. Mediul de auxanograme pentru zaharuri, a cărui formulă o dăm mai jos, se topeşte la baie marină în fierbere şi se aşteaptă ca temperatura mediului topit să scadă la 55°C.

4. Se varsă o cantitate de 10—15 ml din acest mediu (conţinutul unei eprubete capabil să acopere tot fundul unei cutii Petri) peste emulsia de fung şi se amestecă cele 2 lichide prin răsu-



Scanned with OKEN Scanner

cire rapidă (între cele 2 palme ale mîinilor) a tubului care le conţine.

5. Se varsă repede acest amestec omogenizat în cutia Petri şi se continuă încă amestecarea celor 2 lichide prin agitarea Petriului, în mişcări circulare, pe masa de lucru, după care mediul e lăsat să se răcească.

6. Se pune acum cîte o mică porţiune din fiecare din zaharurile de cercetat, pe suprafaţa gelozei din cutia Petri. Pentru a recunoaşte locul unde a fost pus fiecare zahar se notează pe cutia Petri, încă dinainte de a turna în ea mediul, întîi poziţia precisă a capacului cutiei Petri faţă de cutie printr-o linie verticală trasă cu un creion de scris pe sticlă, care trece atît pe capac, cît şi pe cutie. Apoi pe capac se notează, prin iniţiale sau prin orice alt semn convenţional, locurile în care va fi pusă fiecare substanţă. Cum uneori semicercurile formate de dezvoltarea fungului sînt destul de mari este de dorit (pentru a nu se încăleca unele peste altele) ca pe un Petri să nu se pună mai mult de 4 zaharuri. Ele se vor pune la capetele a 2 diametre perpendiculare unul pe altul, din care unul va coincide cu linia verticală trasă pe capac şi cutie, pentru a fixa poziţia capacului.

7. Zaharurile se vor pune cu vîrful unor peniţe. Noi folosim partea de deasupra a unei peniţe de tip Redis, pe care o fixăm într-o baghetă de sticlă.

8. După ce substanţele de testat au fost distribuite, se va introduce în fiecare Petri, între capac şi cutie (după metoda M. Langeron), o bandeletă de hîrtie de filtru, lată de 3—4 cm. Această hîrtie de filtru, sterilizată, are rolul de a absorbi o parte din apa de condensare de pe interiorul capacului şi a permite evaporarea unei părţi din lichidul de condensare prin spaţiul liber care se creează între capac şi cutie, prin introducerea bandeletei de hîrtie. Nu se întorc plăcile Petri cu capacul în jos.

9. Cu grijă ca plăcile Petri să rămînă perfect orizontale, pentru a nu se scurge într-o direcţie sau alta o parte din zaharurile topite în contact cu geloza, se aşteaptă 48 de ore, cînd se vor citi rezultatele, notîndu-se în dreptul căror zaharuri s-au format suprafeţele semicirculare de asimilare.

Pentru proba de asimilarea zaharurilor, mediul necesar este următorul :

| | | |
|---|---|---|
| Apă distilată . . . . . | 1 000 | ml |
| Fosfat monopotasic . . . . | 1 | g |
| Sulfat de magneziu . . . . | 0,5 | g |
| Geloză (nespălată) . . . . | 25 | g |



Scanned with OKEN Scanner

Noi preferăm să adăugăm și sulfat de amoniu 5 g, dar utilizăm geloză spălată. Spălarea gelozei se face punînd-o într-un săculeț de tifon și lăsînd să curgă pe ea, 24 de ore, apă de la robinet. Se lasă apoi săculețul cu geloza o oră în apă distilată.

**Metoda Institutului Pasteur din Paris.** Zaharurile, sub forma de soluții 20%, sînt introduse în discuri de hîrtie de filtru cu un

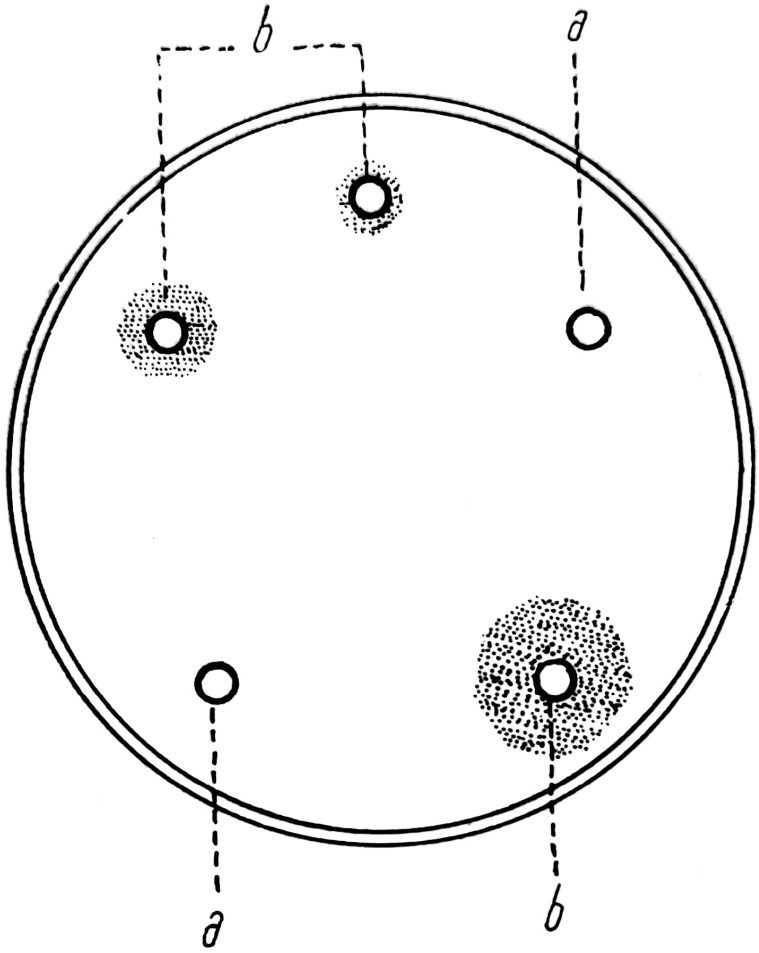



*Fig. 120.* — Metoda auxanografică realizată cu rondele de hîrtie de filtru îmbibate cu soluții concentrate din diferite zaharuri : *a* — zahăr neasimilat ; *b* — zahăr asimilat (de diferite grade) (în Y. J. Golvan și E. Drouhet).

diametru de 1 cm. Se pun pe fiecare disc cîte 2 picături din zaharul respectiv. Apoi discurile sînt uscate la etuvă.

Se pune într-o cutie Petri mediul de auxanograme arătat mai sus. Se însămînțează întreaga suprafață cu emulsia de cultură și se așază apoi discurile cu zaharuri. Dacă discurile sînt colorate deosebit pentru fiecare din zaharuri, le vom recunoaște cu ușurință, fără a mai fi nevoie să notăm locul unde au fost puse.

Zaharurile asimilate se recunosc prin creșterea realizată în jurul discurilor respective (fig. 120).



Scanned with OKEN Scanner

## Asimilarea azotului

Este un alt caracter important de determinare a speciilor de *Candida*. Metoda de testare este asemănătoare, dar mediul e diferit. El va avea pentru auxanograma azotului formula următoare :

| | | |
|---|---|---|
| Apă distilată . . . . . | 1 000 | ml |
| Fosfat monopotasic . . . . | 1 | g |
| Sulfat de magneziu . . . . | 0,5 | g |
| Glucoză pură . . . . . | 20 | g |
| Geloză spălată . . . . . | 20 | g |

O precauție care trebuie luată în auxanograme, și în special, în acelea de azot, este ca tulpina să fi fost însămînțată de 24—48 de ore. În culturile mai vechi se găsesc și levuri moarte, care pot servi levurilor vii ca material azotos. Ele pot falsifica rezultatele.

Dintre substanțele azotate se utilizau mai înainte : nitratul de potasiu, sulfatul de amoniu, histidina, triptofanul, ureea, asparagina, peptona. Azi nu se mai utilizează decît primele două și peptona, care servește și ca martor, întrucît trebuie să fie totdeauna pozitivă. Lipsa de pozitivitate a peptonei înseamnă că nu s-a lucrat corect și că lucrarea trebuie reluată.

## Alte reacții biochimice utilizate pentru determinarea anumitor specii de Candida

**Scindarea arbutinei.** Unii fungi au proprietatea de a scinda molecula de arbutină sau de esculină. Acești glucozizi în contact cu fungul se transformă în agluconi, care dau o culoare neagră, cu ionii ferici. Reacția se practică în felul următor :

— se adaugă la mediul Sabouraud glucozat 2% o cantitate de 0,5% arbutină sau esculină. În momentul în care turnăm acest mediu pe fundul unei cutii Petri, adăugăm în el și cîteva picături dintr-o soluție foarte diluată de triclorură de fier. După solidificare se însămînțează în strie fungul de testat. În jurul coloniei liniare produse apare în cazurile pozitive după 4—6 zile, o colorație neagră, care se vede foarte bine privind dosul cutiei Petri, unde și colonia însăși apare ca o dungă neagră.

**Scindarea grăsimilor.** Se utilizează metoda Eijkman, practicată de Lodder și Kregger Van Rij, în modul următor :

— Se sterilizează la autoclav seu de vacă topit și filtrat în prealabil la cald, prin hîrtie de filtru. Acest seu topit se toarnă în



Scanned with OKEN Scanner

strat subţire pe fundul unei cutii Petri. Cum el se încheagă foarte repede în contact cu sticla rece şi va face din această cauză un strat neuniform, este necesar ca placa Petri să fi fost mai înainte încălzită şi să fie încă bine caldă la turnarea seului.

Se ţine placa Petri cu seul închegat în strat uniform subţire la frigider cîteva ore. Pe de altă parte se prepară un mediu Gorodkowa, în care s-a adăugat 0,1% carbonat de calciu. Mediul se topeşte la baie marină, se lasă să se răcească pînă la 40°C, adică la limita de închegare, şi se toarnă în strat subţire peste seul din Petri (abia scos de la frigider). În felul acesta căldura mediului gelozat topit nu va deranja uniformitatea stratului de seu şi se vor forma în Petri 2 straturi subţiri suprapuse : jos — seul şi deasupra — mediul Gorodkowa. După închegarea completă a mediului Gorodkowa se însămînţează în strie fungul de testat. În 8—10 zile va apare în cazurile pozitive o dungă albă, ca de var (de un alb caracteristic), care se observă cu claritate pe dosul fundului cutiei Petri, în dreptul striei de însămînţare făcute, datorită sărurilor de calciu a acizilor graşi eliberaţi de către fung, din seu.

**Alcoolul, singura sursă de carbon.** Sînt unii fungi care pot scoate din alcool carbonul necesar dezvoltării lor.

Se utilizează mediul următor :

| | | |
|---|---|---|
| Sulfat de amoniu . . . . | 1 | g |
| Fosfat monopotasic . . . . | 1 | g |
| Sulfat de magneziu . . . . | 0,5 | g |
| Alcool etilic . . . . . | 30 | ml |
| Apă . . . . . | 1 000 | ml |

Se repartizează în eprubete şi se sterilizează 15 min., la 120°C. Alcoolul e deci în cantitate de 3%. Se însămînţează fungul şi se lasă tubul 7 zile la temperatura camerei sau la 25°C. După acest timp se observă cantitatea de levuri pe fundul eprubetei şi pe pereţii ei. Cînd creşterea e abundentă, unele specii oxifile produc şi inel, şi văl.

## Identificarea speciei Candida albicans

După cum am văzut mai sus, determinarea speciilor aparţinînd genului *Candida* cere efectuarea unei serii de probe biochimice. Dintre aceste specii, aceea care e cea mai frecvent întîlnită este *Candida albicans*, a cărei identificare poate fi făcută şi în afara probelor de mai sus prin alte 2 probe simple, graţie că-



Scanned with OKEN Scanner

rora putem fi scutiți de a le mai efectua pe celelalte. E bine dar să începem determinarea unei specii de *Candida* cu aceste 2 probe simple și să trecem la celelalte probe numai dacă cele dintîi nu au arătat că e vorba de *Candida albicans*.

**Producerea de clamidospori.** *Candida albicans*, cu excepția unei specii înrudite, *Candida stelatoidea*, este singura capabilă de a produce clamidospori. Pentru a ne convinge dacă fungul de identificat este sau nu capabil de a produce clamidospori ne servim de metoda de filamentizare pe placa Petri, expusă mai sus, utilizînd ca mediu de cultură mediul P.C.B. Pe acest mediu *Candida albicans* va produce, la 26°C, în 24—48 de ore, nu numai filamente, dar și clamidospori caracteristici, formații globuloase mari, cu dublu contur, care au 8—12 microni în diametru (fig. 121). Se produc de cele mai multe ori pe filamente, dar există și cazuri în care se găsesc numeroși clamidospori realizați prin transformarea directă a unor levuri, fără o filamentizare prealabilă, mai ales atunci cînd în locul metodei culturii în plăci Petri se utilizează metoda culturilor pe lamă în mediul Gorodkowa sau Sabouraud glucozat 2%.

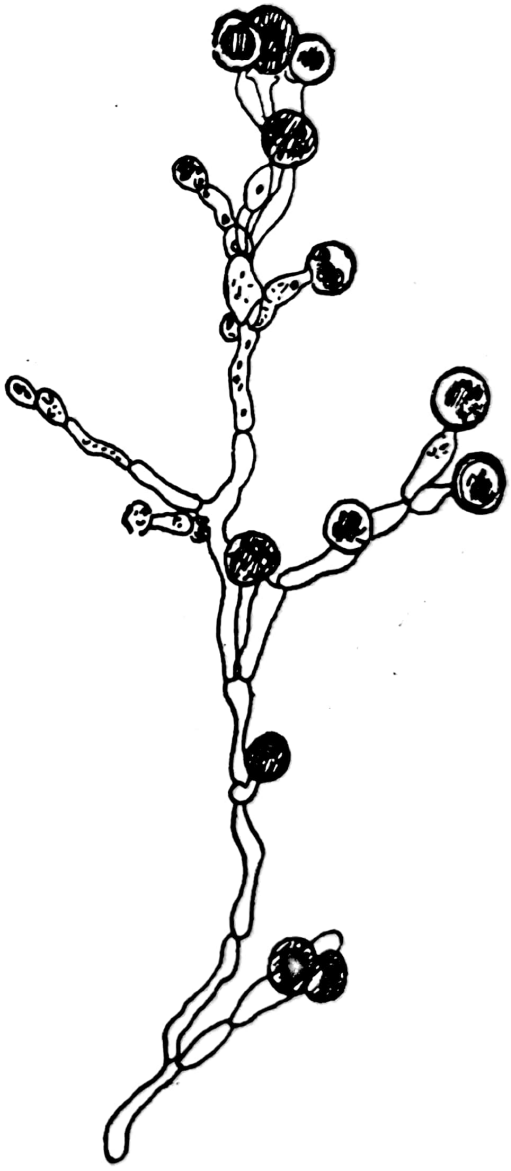


*Fig. 121.* — Clamidospori la *Candida albicans* (după P. Vuillemin).

Pentru a diferenția pe *C. albicans* de *C. stelatoidea* vom însămînța fungul pe o geloză cu sînge, pe care coloniile de *C. stelatoidea* capătă o înfățișare stelată caracteristică.

Al doilea procedeu de recunoaștere a *C. albicans* e acela recomandat de Taschdjian și colab., de menținere a fungului 3—4 ore, la 37°C, în ser sanguin. În aceste condiții *C. albicans* produce tuburi germinative — adică un început de filamentizare. E indiferent dacă serul pro-



Scanned with OKEN Scanner

vine de la om sau de la animale de laborator, precum și faptul dacă a fost sau nu inactivat. Și în acest procedeu *C. albicans* se aseamănă cu *C. stelatoidea.*

## Alte specii ale genului Candida

Dacă excludem pe *C. albicans* și *C. stelatoidea,* ușor de identificat, celelalte specii ale genului *Candida* vor fi (recunoscute) identificate pe baza rezultatelor reacțiilor biochimice și, în primul rînd, a fermentațiilor și auxanogramelor. În 1938 M. Langeron și Guerra au făcut o revizie a genului *Candida.* Ei au anulat multe nume de specii ca nefiind suficient caracterizate („nomina nuda"), au trecut în sinonimie alte nume de specii pentru că se raportau la o specie cunoscută și numită mai dinainte altfel, și au ajuns la concluzia existenței în genul *Candida* a numai 16 specii. Acest număr a fost ulterior crescut de diferiți alți autori, astfel încît în ediția din 1952 a manualului lui J. Lodder și N. J. W. Kregger Van Rij, numărul de specii ale genului *Candida* era de 30 (plus șase varietăți). El se ridică la 81 în ediția recentă (1970) a manualului editat tot de J. Lodder, ca o continuare a aceluia din 1952, în studiul făcut în acest manual de către N. Van Uden și H. Buckley. Această creștere se datorește faptului că, între timp, pentru realizarea auxanogramelor și fermentațiilor s-a propus utilizarea și a altor substanțe decît cele 6 zaharuri clasice (unii alcooli, unii glucozizi, unii acizi) iar vechile specii, caracterizate prin procesele biochimice, s-au diversificat prin răspunsul deosebit la acești reactivi noi.

În aceste condiții determinarea speciilor genului *Candida* se îngreuiază considerabil și, cu atît mai mult, cu cît unele din noile substanțe reclamate de noua sistematică, cum e spre exemplu galactitolul și ribitolul, nu există în mod curent în laboratoarele de chimie, iar procurarea lor în laboratoarele de analize



Scanned with OKEN Scanner

medicale, de pe lîngă spitale, cere eforturi deosebit de mari.

Dintre speciile studiate de Langeron şi Guerra în 1938 cele mai frecvent întîlnite în flora intestinală sînt următoarele :

— *Candida albicans*
— *Candida pseudotropicalis*
— *Candida guillermondi*
— *Candida tropicalis*
— *Candida kruzei.*

Dăm în tabelele IV şi V modul în care ele răspund în reacţiile biochimice cu substanţele clasice, la care, la zaharuri, am adăugat inulina şi trehaloza şi am suprimat dintre substanţele azotate pe toate, în afară de azotatul de potasiu şi de sulfatul de amoniu, singurele care mai sînt luate azi în consideraţie.

*Tabelul IV*

**Zimograma**

| Specia | Glucoză | Galactoză | Zaharoză | Maltoză | Lactoză | Rafinoză | Trehaloză | Inulină |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *C. albicans* | + | ± | − | + | − | − | ? | − |
| *C. pseudotropicalis* | + | + | + | − | + | + | − | +++ |
| *C. guillermondi* | + | + | + | − | − | + | + | ± |
| *C. tropicalis* | + | + | + | + | − | − | + | − |
| *C. kruzei* | + | − | − | − | − | − | − | − |

*Tabelul V*

**Auxanograma**

| Specia | Zahăr | | | | | | | | Azot | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Glucoză | Galactoză | Zaharoză | Maltoză | Lactoză | Trehaloză | Rafinoză | Inulină | $NO_3K$ | $SO_4(NH_4)_2$ |
| *C. albicans* | + | + | + | + | − | + | − | − | − | + |
| *C. pseudotropicalis* | + | + | + | − | + | − | + | + | − | + |
| *C. guillermondi* | + | + | + | + | − | + | + | + | − | + |
| *C. tropicalis* | + | + | + | + | − | − | − | − | − | + |
| *C. kruzei* | + | − | − | − | − | − | − | − | − | + |

**Reacţii de culoare.** Unele specii de *Candida* pot fi diferenţiate şi prin felul în care reduc sărurile de tetrazoliu, ceea ce se manifestă prin apariţia de culturi colorate deosebit. Se foloseşte me-



Scanned with OKEN Scanner

diul Sabouraud cu cloramfenicol, la care se adaugă, în cantitate de 0,10‰, 2,3,4-trifeniltetrazolium. După 24—48 de ore se notează culoarea pe care a căpătat-o colonia şi care pentru *C. albicans* şi *C. kruzei* este albă, pentru *C. stelatoidea* şi *C. pseudotropicalis* — roză, iar pentru *C. tropicalis* — roşu-violet. Acest mediu e criticat de Golvan pe considerentele următoare : e vorba adesea de nuanţe de culoare dificil de apreciat, între roşu şi roz. Există şi tulpini de *C. albicans* care reduc slab colorantul şi dau o culoare roză. În sfîrşit, metoda nu ne poate fi de folos la izolarea directă a tulpinii din fecale, ci numai după purificarea tulpinii de bacterii, întrucît bacteriile din materiile fecale pot reduce la fel tetrazoliul şi falsifica rezultatele.

O încercare asemănătoare de a identifica unele tulpini chiar la izolarea lor prin colorarea coloniei s-a făcut şi cu mediul Nickerson. Cu acest mediu se urmăreşte dacă sulfitul de bismut, care nu e colorat, se reduce de către fung în sulfură de bismut, care e neagră. Formula mediului Nickerson $B_1GGY$ este :

| | |
|---|---|
| Glucoză . . . . . | 10 g |
| Glicocol . . . . . | 10 g |
| Citrat de bismut amoniacal . . . . | 5 g |
| Extract de levuri . . . . . | 1 g |
| Sulfit de sodiu . . . . . | 3 g |
| Geloză . . . . . | 20 g |
| Apă distilată . . . . . | 1 000 g |

Nu se autoclavează, ci se încălzeşte numai la 80°C, temperatură la care se formează sulfitul de bismut. Acesta are tendinţa a se depune şi mediul trebuie agitat pentru omogenizare, în momentul cînd se toarnă în plăci sau tuburi. Contaminarea bacteriană este excepţională. Lectura se face la 48—72 de ore după însămînţare. *C. albicans* dă colonii negre dar şi *C. kruzei* şi *C. tropicalis* pot da colonii la fel de negre. Pe lîngă aceasta, este greu de apreciat între negru şi negru-cenuşiu, pe care-l pot lua alte specii. *C. guillermondi* ia o culoare brună închis, iar *C. pseudotropicalis* — o culoare brun-roşcată. Pe lîngă aceasta mediul nu împiedică dezvoltarea bacteriilor fecale, care pot influenţa culoarea şi falsifica rezultatul.

**Numărarea de colonii.** Prezenţa a numai cîţiva fungi din genul *Candida* în cavitatea intestinală nu are nici o semnificaţie patologică. Prezenţa unui număr mare de fungi poate avea o mare importanţă patologică, în special prin acţiune alergică. De aceea nu e de ajuns să notăm că s-au găsit fungi blastosporaţi, ci este nece-



Scanned with OKEN Scanner

sar a face şi o apreciere cantitativă aproximativă : rari, relativ frecvenţi, foarte frecvenţi, excesiv de frecvenţi.

În cazul unei cantităţi mari de fungi, putem face o apreciere mult mai exactă prin metoda numărării de colonii, raportînd numărul de colonii la unitatea de greutate a materiilor fecale.

Prezentăm mai jos metoda de care s-a servit Vlad Balotă în cercetările pe care le-a făcut asupra florei micotice endogene din cavitatea intestinală :

— se porneşte de la o cantitate determinată de materii fecale, din care se face o diluţie 1/10 ; de preferinţă 5 g de materii diluate cu 50 ml apă distilată. După omogenizare fiecare ml din această diluţie va conţine 0,1 g materii fecale ;

— se ia de aici (folosind sticlărie şi apă sterilizată) o picătură, deci 1/20 din 1 ml, şi se diluează în eprubeta de hemoliză nr. 1 cu 9 picături apă distilată. O picătură din această eprubetă nr. 1 va conţine 0,0005 materii fecale ;

— dacă o picătură din eprubeta nr. 1 o diluăm la fel cu 9 picături apă distilată în eprubeta nr. 2 vom obţine 0,00005 pe picătură ;

— o picătură de aci, diluată la fel în eprubeta nr. 3, ne va da 0,000005 g pe picătură, adică 5 gamma de materii fecale pe picătură ;

— se ia acum o cutie Petri, pe fundul căreia se toarnă un strat de mediu Sabouraud glucozat 2% adiţionat cu cloramfenicol ;

— se împarte fundul în 4 cvadrate (cu însemnări făcute pe capac) şi se pune cu pipete la fel calibrate, cîte o picătură din fiecare din cele 4 diluţii pe care le-am făcut, adică în care se găsesc respectiv cantităţile de 0,005, 0,0005, 0,00005, 0,000005 g de materii fecale ;

— aceste picături se întind în cvadratele respective, cu o pipetă Pasteur, închisă la capăt şi cudată în unghi drept ;

— se numără coloniile care se dezvoltă în 48 de ore.

**Citirea rezultatelor.** Pentru ultimul cvadrat în care am însămînţat 5 gamma de materii fecale vom înmulţi numărul de colonii crescute cu un milion şi vom împărţi produsul cu 5, pentru a afla numărul de colonii pe gram. Sau, mai simplu, vom înmulţi cu 200 000 numărul de colonii crescute. Fie, spre exemplu, 4 numărul de colonii crescute. Aplicăm formula :

$$\frac{4 \times 1\,000\,000}{5} = 800\,000 \quad \text{sau } 4 \times 200\,000 = 800\,000.$$

Pe cvadratul 3 cantitatea de materii fecale pe care am însămînţat-o a fost de 10 ori mai mare. Ar fi de aşteptat să găsim aci 40 de



Scanned with OKEN Scanner

colonii în loc de 4 (în exemplul luat mai sus). Dar corespondența între numărul de colonii crescute și diluțiile de la care s-a pornit nu e niciodată perfectă. E mai bine să calculăm numărul de colonii pe gram și pentru acest cvadrat și să facem apoi media între cifrele găsite pe ambele cvadrate 3 și 4 — cu deosebirea că pentru cvadratul 3 formula de calculare va fi $\frac{\text{Numărul găsit} \times 100\,000}{5}$ sau numărul găsit înmulțit cu 20 000.

Ex.: $\frac{48 \times 100\,000}{5} = 960\,000$ sau $48 \times 20\,000 = 960\,000$.

Media între cele 2 cifre e 880 000 — pe care o vom considera ca număr de colonii pe gram.

În general, în cazurile parazitozei cu o așa de mare cantitate de fungi, coloniile din cvadratele 1 și 2 sînt confluente și nu se pot număra.

## Speciile genului Geotrichum

Al doilea gen de fungi pe care-l putem găsi cu o mare frecvență în materiile fecale este *Geotrichum*. Îl recunoaștem ușor prin cultura pe lamă. Are o dezvoltare rapidă, în forme stelate largi, cu filamente lungi, formate din artrospori dispuși în zigzaguri. Dar pentru a aparține genului *Geotrichum* fungul nu trebuie să mai aibă alți spori imperfecți, decît numai artrosporii. Dacă împreună cu artrosporii e capabil să producă și blastospori, el aparține genului *Trichosporon*, ceea ce vom putea vedea cu ușurință tot pe cultura pe lamă.

Specia cea mai frecvent întîlnită a genului *Geotrichum* este *G. candidum*, așa precum în genul *Candida* specia cea mai frecvent întîlnită era *C. albicans*. Au existat în trecut numeroase nume de specii de *Geotrichum*. Ele au fost trecute, rînd pe rînd, în sinonimie cu specia *G. candidum* și se ajunsese în consecință la părerea că aceasta ar fi unica specie a genului *Geotrichum*.



Scanned with OKEN Scanner

În 1964 J. Morenz a revăzut sistematica genului *Geotrichum*, a confirmat foarte multe din sinonimiile făcute, dar a constatat că există totuşi 7 specii, care pot fi caracterizate prin reacţii biochimice. Aceste specii sînt : *G. fragrans, G. candidum, G. klebahni, G. hirtum, G. loubieri, G. dulcitum* şi *G. gracile.*

Pentru că existenţa acestor 7 specii a fost stabilită de foarte scurtă vreme şi prezenţa lor în ţara noastră nu a fost încă îndeajuns căutată, dăm în tabelul VI reacţiile biochimice precum şi cheia dicotomică de identificare pe baza cărora cercetătorii care găsesc un caz de geotricoză să poată face identificarea speciei.

*Tabelul VI*

**Reacţiile biochimice ale speciilor genului Geotrichum (în Morenz)**

| Specia | Fermentează glucoza | Asimilaţia | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Xiloză | Celobioză | Lactoză | Eritrit | Melibioză | Glucoză | Galactoză | Maltoză | Zaharoză |
| *G. fragrans* | + | − | − | − | − | − | + | + | − | − |
| *G. candidum* | − | + | − | − | − | − | + | + | − | − |
| *G. Klebahni* | − | + | − | − | − | − | + | + | − | − |
| *G. hirtum* | − | + | + | + | + | − | + | + | + | + |
| *G. loubieri* | − | + | + | + | − | + | + | + | + | + |
| *G. dulcitum* | − | + | + | + | − | − | + | ± | + | + |
| *G. gracile* | − | + | + | − | − | − | + | ± | ± | − |

După cum se vede, toate cele 7 specii sînt azimatice cu excepţia speciei *G. fragrans.* Fermentaţia glucozei reprezintă deci un caracter uşor pentru a o identifica.

Numai *G. loubieri* e capabilă de a asimila melibioza şi numai *G. hirtus* poate asimila eritritul.

Cheia dictomică de identificare a speciilor genului *Geotrichum* :

1. Fermentează glucoza — *G. fragrans*
   Nu fermentează glucoza (azimatice) — *2*
2. Asimilează celobioza — *3*
   Nu asimilează celobioza — *G. candidum* / *G. klebahni*
3. Asimilează eritritul — *G. hirtus*
   Nu asimilează eritritul — *4*
4. Asimilează melibioza — *G. loubieri*
   Nu asimilează melibioza — *5*
5. Asimilează lactoza — *G. dulcitum*
   Nu asimilează lactoza — *G. gracile*



Scanned with OKEN Scanner

Cele 2 specii *G. candidum* și *G. klebahni* diferă prin aceea că prima posedă numeroase diviziuni dicotomice terminale, la periferia coloniei, pe cînd *K. klebahni* nu le posedă. Artrosporii la *G. klebahni* sînt mai uniformi și mai subțiri, avînd în lățime între 2—5 microni, pe cînd la *G. candidum* măsoară 3—9 microni. În sfîrșit, *G. klebahni* nu crește la 37°C, ceea ce nu face probabilă găsirea ei în flora intestinală.

## Caracterele genului Criptococcus

Acest gen prezintă două caractere morfologice importante :

1. nu filamentizează (caracter pe care îl împărtășește cu genul *Torulopsis*) ;
2. prezintă o capsulă uneori foarte groasă.

Ca un caracter de orientare : culturile de *Criptococcus* au o culoare gălbuie și sînt foarte mucoase.

Caractere de confirmare :

**Căutarea capsulei.** Se suspendă într-o picătură de apă distilată o foarte mică parcelă de cultură. Se pune pe o lamelă o picătură de tuș de China (picătura va fi cam pe jumătate cît picătura în care am omogenizat cultura). Se întoarce lamela cu fața cu picătura în jos și se acoperă cu ea picătura cu cultura de *Geotrichum*. Cele 2 lichide se amestecă între ele și tușul de China se găsește diluat în proporție de 1 : 3.

Se diafragmează microscopul. Se vede foarte bine pe fondul negru al tușului elementele blastosporate înconjurate de o capsulă groasă.

**Reacția ureazei.** Fungul hidrolizează ureea transformînd-o în carbonat de amoniu, care dă mediului o reacție alcalină. Institutul Pasteur din Paris a preparat mediul necesar sub numele de ureeindol. Se găsește în fiole a 2 ml. Reactivul are o culoare galbenă. Se distribuie în 2 eprubete de hemoliză, cîte 1 ml în fiecare



Scanned with OKEN Scanner

eprubetă. Una din ele se însămînţează cu fungul de testat, iar cealaltă cu un fung care ştim bine că nu posedă urează cum e *Candida albicans*. Acest al doilea tub va servi ca martor.

Tuburile se pun la termostat, la 37°C.

În reactiv există un indicator de culoare, care la reacţie alcalină ia o culoare roş-violacee. Criptococul va produce această culoare fiindcă posedă urează, pe cînd culoarea tubului martor rămîne nealterată sau virează spre galben.

Pentru acei care pot să şi-l prepare singuri în laborator, mediul uree-indol are formula :

| | | |
|---|---|---|
| L-triptofan . . . . . | 3 | g |
| Fosfat monopotasic . . | 1 | g |
| Fosfat bipotasic . . . | 1 | g |
| Clorură de sodiu . . . | 5 | g |
| Uree . . . . . | 20 | g |
| Alcool 95° . . . . . | 10 | ml |
| Soluţie roşu fenol 1% . | 2,5 | ml |
| Apă distilată . . . . . | 1 000 | ml |

Se lasă să se dizolve toate ingredientele de mai sus şi se sterilizează prin filtru Seitz. Se repartizează steril în fiole (H. Cassagne).

Dintre speciile genului *Candida, C. humicola,* care şi ea e susceptibilă de a se găsi în materiile fecale, împărtăşeşte cu *Criptococcus* proprietatea de a poseda urează şi deci de a produce hidrolizarea ureei.

O altă reacţie caracteristică pentru speciile genului *Criptococcus* e producerea de polizaharide asemănătoare cu amidonul, atunci cînd se dezvoltă pe anumite medii, cum e acela indicat de Ashner, şi a cărui formulă este :

| | | |
|---|---|---|
| Sulfat de amoniu . . . . | 1 | g |
| Sulfat de magneziu . . . . | 0,50 | g |
| Fosfat monopotasic . . . . | 1 | g |
| Glucoză . . . . . | 10 | g |
| Thiamină . . . . . | 200 | gamma |
| Apă distilată . . . . . | 1 000 | ml |

Se ajustează la pH = 4,5 cu acid clorhidric (foarte important). După dizolvarea ingredientelor se adaugă 25 g de geloză, care se topeşte prin fierbere, se filtrează la cald şi se repartizează în tuburi.



Scanned with OKEN Scanner

Se autoclavează 15 min., la 115°C.

Se însămînţează mediul de mai sus.

Se menţine cultura 2 săptămîni, apoi se toarnă la suprafaţa mediului cîteva picături de lugol. În caz că s-a format amidonul, se produce o coloraţie albastră închis.

Şi în această proprietate de a produce amidon *Candida humicola* se aseamănă cu speciile genului *Criptococcus.*

## Blastocystis hominis

Dintre paraziţii susceptibili a fi întîlniţi în examenele coproparazitologice, ultimul de care ne vom ocupa în acest volum e *Blastocystis hominis.* Se găseşte uneori cu o deosebită abundenţă în scaune moi, diareice, sau în scaune cu o vîscozitate crescută. Prezintă o formă sferică, fiind alcătuit din două pături. Una periferică, relativ subţire şi în care se găsesc, în general, în poziţii diametral opuse, două sau mai multe nuclee. Ea înconjură porţiunea internă (cea de a doua pătură), care a fost considerată multă vreme ca o vacuolă imensă, centrală, sau uneori excentrică. Este însă o porţiune plină cu o substanţă de natură nedefinită, prezentînd o granulaţie foarte fină. Nu se colorează cu coloranţi pentru grăsimi, amidon sau celuloză. Unii autori nu o consideră ca pe o vacuolă, ci o numesc „corpul interior", tocmai pentru că e vorba de o masă plină (fig. 122 şi 123).

Parazitul măsoară 10—30 de microni în diametru şi uneori e învelit cu o capsulă de natură mucoasă, mai mult sau mai puţin dezvoltată. Se înmulţeşte în intestin prin diviziune binară şi se întîlnesc, nu rareori, la examenul coprologic, forme în diviziune mai mult sau mai puţin înaintată.

Ho Thi Sang avertizează că un *Blastocystis* ar putea fi confundat cu un chist de amibă, dar examinarea materiilor fecale în apă de robinet deosebeşte net cele două elemente parazitare.



Scanned with OKEN Scanner

Apa de robinet, javelizată, lizează blastociștii și lasă intacte chisturile de amibe.

Parazitul se cultivă ușor pe medii bogate în proteine. Noi l-am cultivat pe mediul Löffler acoperit cu soluția Locke. În culturi apar forme amiboide (foarte rare la examenul direct al materiilor fecale). Ele pot fi de un volum dublu sau și mai mari și au capacitatea de a emite pseudopode hialine, uneori într-un ritm viu.

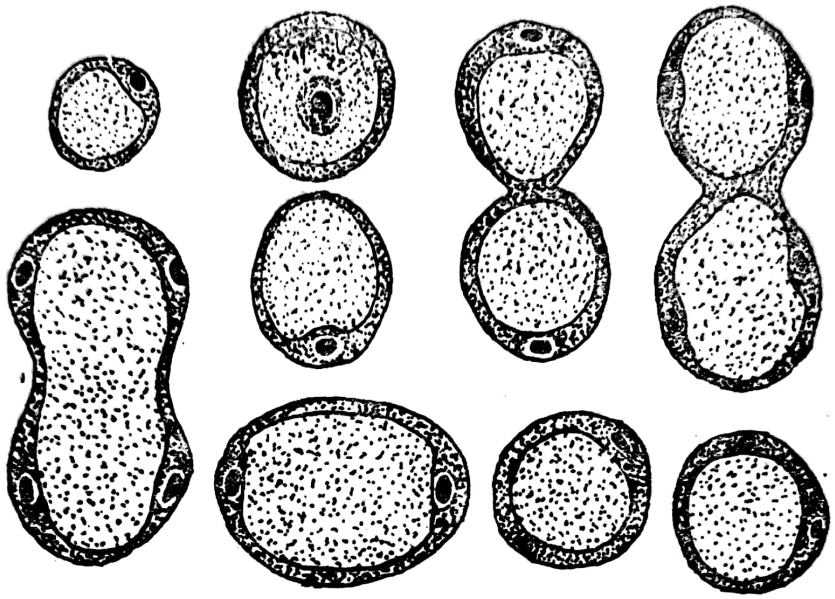


*Fig. 122. — Blastocystis hominis (după* **E. Brumpt).**

Dar pseudopodele se produc și se retractă fără a fi determinat vreo deplasare a parazitului. Aceste forme au putința să se dividă prin sciziune binară egală, dar uneori și neegală. Uneori apar pe suprafața lor muguri care cresc, se desprind și se transformă în alte forme amiboide.

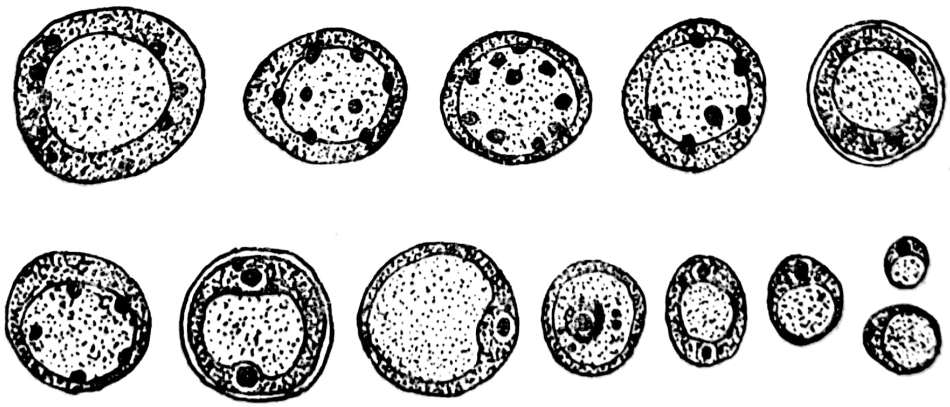


*Fig. 123. — **Blastocystis hominis*** (alte aspecte) (după E. Brumpt).



Scanned with OKEN Scanner

Tot în culturi apar formele granulare. Corpul se umple cu granule care, în urma distrugerii parazitului care le-a produs, se răspîndesc în mediu şi se transformă în elemente noi. Este deci încă un nou fel de înmulţire prin „sporulaţie", de care este capabil parazitul.

Comportarea cu totul neobişnuită şi diversele sale forme de înmulţire pune serioase probleme în ceea ce priveşte sistematica parazitului. Cei mai mulţi autori îl consideră ca pe un organism vegetal — un fung — dar greu de încadrat în sistematica fungilor. Alţi autori — mai puţini la număr — îl consideră ca fiind un protozoar. Au existat într-o vreme supoziţii potrivit cărora el ar reprezenta o formă de închistare a unui parazit flagelat. S-a renunţat la această părere, dar ar putea fi vorba de un parazit protozoar cu totul deosebit de cei deja cunoscuţi şi pentru care ar trebui creat un nou nume de familie şi de gen. Între autorii care — mai recent — se întreabă insistent asupra apartenenţei lui *Blastocystis* la protozoare citäm pe H. Zierdt, Wildene S. Rude şi Brian S. Bull. Aceşti autori remarcă într-un articol din 1967 următoarele fapte care apropie pe *Blastocystis* de protozoare şi-l îndepărtează de fungi.

| *Bl. hominis* | *Fungi* |
|---|---|
| Lipsiţi de perete. Au numai o membrană subţire, capabilă de a produce vezicule micropinocitotice. | Au un perete de obicei gros. Hrana transferată prin difuzie. |
| Creşte în culturi numai cu bacterii supraadăugate. | Se dezvoltă în culturi fără de bacterii. |
| Preferă un pH neutru sau slab alcalin. | Preferă un pH acid şi rezistă la un pH foarte scăzut. |
| Nu produce blastospori, nici micelii. | Poate produce blastospori şi micelii. |
| Se reproduce prin sciziune binară sau sporulaţie. | Se reproduce prin înmugurire, fragmentare sau sporulaţie. |
| Extinde şi retractă pseudopode. | Nu produce pseudopode. |
| Fagocitează bacterii şi particule. | Nu fagocitează. |
| Temperatura optimă este 37°C. | Temperatura optimă sub 37°C. |
| Nu se dezvoltă la temperatura camerei. | Se dezvoltă şi la temperatura camerei. |
| Moare la +4°C şi într-un mediu uşor hipo- sau hipertonic. | Rezistă la asemenea condiţii. |



Scanned with OKEN Scanner

Pe baza caracterelor arătate autorii de mai sus conchid că *Blastocystis* nu poate fi clasat nici ca fung, nici ca protozoar, dar că e mai aproape de protozoare.

La argumentele aduse de ei în favoarea apartenenței parazitului la protozoare noi am mai adăuga și un argument terapeutic și anume sensibilitatea lui la Metronidazol, medicament propriu pentru combaterea protozoarelor (amibe și flagelate) și care, în general, favorizează dar nu contracarează dezvoltarea fungilor.

Trebuie pusă în discuție și valoarea patogenă a acestui parazit. Cei mai mulți autori îl consideră ca lipsit de patogenicitate proprie directă, și mai degrabă ca o mărturie a unei anumite stări fiziopatologice nefavorabile, în cursul căreia se dezvoltă. Alți autori — și noi ne raliem la aceștia din urmă — îl consideră capabil de a provoca, prin el însuși, procese patologice, prin toxinele pe care le poate produce, și manifestări de alergie, atît intestinală, cît și cutanată — care fac necesară îndepărtarea sa prin tratamente apropriate.

Mai multe cazuri clinice pe care am avut ocazia să le tratăm ne-au întărit această convingere.

Dacă parazitul ar fi protozoar și nu fung, locul lui nu era aici, ci la capitolul protozoarelor parazite. Totuși, cum majoritatea autorilor continuă să-l menționeze ca pe un micet, l-am lăsat deocamdată în acest capitol asupra fungilor, în care îl așază o veche tradiție medicală și în care, în consecință, medicii se simt înclinați să-l caute.

Scanned with OKEN Scanner

# Bibliografie


ALLEN A.V.H., RIDLEY D. S. — Further observations on the formol-ether concentration techniques for faecal parasites, *J. clin. Path.*, 1970, 23, 6.

ANTIPIN D. N., ERSOV V. S., ZOLOTAREV N. A., SALIAEV V. A. — Parazitologia i invazionnâie bolezni selbshoziaistevnnih jivotnâh, Moscova, 1959.

BAILENGER J. — Coprologie parasitaire et fonctionnelle, ed. 2, 1965, Ed. E. Brouillard, Bordeuaux.

BAILENGER J., ANDREIEUX M., PAUTRIZEL R. — Valeur comparée de quelques méthodes d'analyses en coprologie parasitaire humaine, *Ann. Biol. clin.*, 1962, *20*, 7—9, 689.

BAILENGER J. — Mécanisme et facteurs de concentration parasitaire dans les méthodes „diphasiques" en coprologie, *Ann. Biol. clin.*, 1963, *21*, 10—12, 805.

BAILENGER J. — Les méthodes diphasiques de concentration parasitaire en coprologie, *Ann. Parasit hum. comp.*, 1966, *41*, 6, 607.

BALOTĂ V. — Contribuţii la studiul florei levuriforme endogene intestinale, Teză de doctorat, I.M.F., Bucureşti, 1971.

BAUGHAN R. E., MORALES AZORIDES — Parasitism în Thailand. An evaluation by various concentration techniques, *Amer. J. clin. Path.*, 1971, *55*, 2, 221.

BEAVER P. C. — Observations on the nature of Charcot-Leyden cristals, *Bull. Soc. Path. exot.*, 1962, *55*, 4, 471.

BERENDIAEV V. M. — Despre o modificare a examenului helmintoovoscopic, potrivită pentru investigaţiile de masă (în limba rusă). *Med. Parazit.* (*Mosk*), 1963, *32*, 6, 687.

BERNARD I. (Mme), CATOR R. (Bodeaux) — Sur une technique simple et pratique d'isolement et d'identification du *Candida albicans*, *C. R. Soc. Gynéc.*, 1958, *28*, 7, 426.

BIDEGARAY H. — Nouvelle méthode de coloration pour l'examen microscopique des selles, *Ann. Parasit. hum. comp.*, 1925, 4, 385.

BLAGG W., SCHLOEGEL E. L., MANSOUR N. S., KHALAF G. I. — A new concentration technique for the demonstration of protozoa and helminth eggs in faeces, *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1955, *4*, 1, 23.

BLASCHIN A. N. — Beobachtungen der Eier von Parasitenwurmern auf einem dunkel oder kontrastierenden Grund, Arch. Schiffs u. Tropen, Hyg, 1931, *35*, 6, 363.

BORDA C. ED., PELLEGRINO J. — An improved stool thick-smear technique for quantitative diagnosis of Schistosoma mansoni infection, *Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo*, 1971, *13*, 2, 71.

BRASSINNE M., PECHEUR M., DEWAELE A., RENARD M. — Rôle de la nature chimique du sel utilisé pour la recherche quantitative des œufs de parasites dans les matières fécales du porc, *Ann. parasit. hum. comp.*, 1973, *48*, 1, 169.

BRAUN M., SEIFERT O. — Die tierischen Parasiten des Menschen, I Teil, Würzburg, 1915.

BROOKE M. M., GOLDMAN MORRIS SADIE A. JOHNSON — Polyvinyl alcohol fixation as a preservative and adhesive for protozoa in dysenteric stools and other liquid material, *J. Lab. clin. Med.*, 1949, *34*, 11, 1 554.

BRUMPT E. — L'étude à microscope de N. Foot, *Ann. Parasit. hum. comp.*, 1925, 3, 252.

BRUMPT E. — Étude sommaire de l'*Entamoeba dispar* n. sp. amibe à Kystes quadrinucléés, parasite de l'homme, *Bull. Acad. Méd.*, Paris, 1925, 94, 943.

BRUMPT E. — Differentiation of the human intestinal amoebae with four-nucleated cysts, *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1928, *22*, 2, 101.

BRUMPT E. — Précis de parasitologie, VI-e édit., Ed. Masson. et Cie, Paris, 1949.




Scanned with OKEN Scanner

BURROWS R. B., SWERDLOW M. A., FROST J. K., LEEPER C. K. — Pathology of Dientamoeba fragilis infections of the appendix, *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1954, *3*, 6, 1 033.
BURROWS R. B. — A new fixative for the diagnosis of intestinal parasites. *Amer. J. clin. path.*, 1967, *48*, 3, 342.
CASSAGNE — Milieux de culture et leurs applications, II-a édit., Ed. de la Tourelle, *Saint Mandé* (*Seine*), 1966.
CASTELLANI A. — Long term observations on pathogenic fungi in culture, *J. trop. Med. Hyg.*, 1961, 3, 60.
CASTELLANI A. — The „Water-cultivation" of pathogenic fungi, *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 1964, *44*, 2, 217.
CAUCHEMEZ L. — Présence d'amibes non iodophiles chez les porcs français. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1922, 11, 6, 391.
CAVAROC M. L. — Guide de coprologie infantile, Ed. Masson et Cie, Paris, 1966.
CHAIA G., CHAIA A. B. Q., MCAULIFFE J., KATZ N., GASPER D. — Coprological diagnosis of *Schistosomiasis*. II comparative study of quantitative methods, *Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo*, 1968, *10*, 6, 349.
CIUREA I. — Die Auffindung der Larven von Opistorchis felineus Pseudoamphistomum danubiense und die morphologische Entwicklung dieser Larven zu den geschlechtsreifen Würmern, *Zschr. Inf. parasit. Frankh. Hyg. der Haustiere*, 1917, 18, 301 şi 345.
CRAIG C. F., FAUST E. C. — Clinical parasitology, Lea & Febiger, Philadelphia, 1949.
DAGUILLON A., MATRUCHOT L. — Cours élémentaire de botanique, Eugène Belin, XIX-e édit. Paris.
DĂNCESCU P., RĂDULESCU SIMONA — Cercetări asupra diagnosticului strongiloidozei. Metoda de cultivare cu cărbune în cutii închise, *Microbiologia* (*Buc.*), 1967, *12*, 1, 35.
DĂNCESCU P., BĂDOIU V., IONESCU H. — Cercetări asupra diagnosticului strongiloidozei prin metoda coproparazitologică Harada şi Mori, *Rev. med. chir.*, Iaşi, 1968, *72*, 4, 977.
DĂNCESCU P. — Cercetări asupra diagnosticului helmintiazelor. Metoda Kostenhaus, *Clujul med.*, 1969, *42*, 1, 67.
DĂNCESCU P. — Méthode larvoscopique quantitative et qualitative utilisant des boîtes fermées pour le diagnostic et l'étude de certains helminthes vétérinaires. *Ann. parasit.*, 1970, *45*, 1, 105.
DĂNCESCU P., SIMA A. — Utilizarea metodei Kato şi Myura în investigaţii helmintologice de masă. *Microbiologia* (*Buc.*), 1972, *17*, 6, 547.
DAVE P. J., SADGIL R. K. — Evaluation of merthiolate iodine formaldehyde concentration techniques as compared with direct smears, brin flotation and zinc sulphate centrifugal flotation techniques, *Indian med. Res.*, 1959, *47*, 4, 371.
DEGAN E., NOSSA L., SINGER E., SABĂU L. — Infestaţie cu Dicrocelium dendriticum cu tablou pseudohodgkinian, *Med. interna* (*Buc.*), 1958, *11*, 1, 733.
DESCHIENS R. — Récherches sur la culture d'*Entamoeba dysenteriae*. Modification du milieu et de la technique de Boeck et Drbolhav, *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1927, *96*, 17, 1 356.
DESCHIENS R. — Affinité alimentaire de l'amibe dysentérique pour la bilirubine, *Bull. Soc. Path. exot.*, 1938, 31, 626.
DESCHIENS R. — L'amibiase et l'amibe dysentérique, Ed. Masson et Cie, Paris, 1965.
DESPEIGNES J., BATTESTI M. R. — Technique simplifiée pour l'identification des levures du genre *Candida*, *Ann. Parasit. hum. comp.*, 1969, *44*, 2, 211.
DOBELL C., O'CONNOR D. W. — The intestinal protozoa of man, London, 1921.
DOPTER CH., DESCHIENS R. — Action de la bilirubine et de la bile totale sur les amibes dysentériques, *C. R. Soc. Biol.* (*Paris*), 1938, 129, 626.
DRBOHLAV J. J. — Une nouvelle preuve de la possibilité de cultiver *E. Dysenteriae*, type *histolytica*, *Ann. Parasit. hum. comp.*, 1925, 3, 349—368.
DROUHET E., VIEU M. — Biologie des infections à *Candida*. I. Diagnostic de laboratoire, *Sem. Hôp. Paris*, 1957, 33, 793.



Scanned with OKEN Scanner

Du Noqer Rondeau M. — Les cestodes parasites de l'homme. Thèse de doctorat à la Faculté de Pharmacie de Paris, 1932.

Dunn F. L. — The TIF direct smear as an epidemiological tool, with special references to counting helminths eggs, *Bull. Org. Mond. Sant.*, 1968, 39, 439.

Engelbrecht H., Jirovec O., Neméseri L., Rosicky B. — Parasitologische Arbeitsmethoden in Medizin und Veterinärmedizin, Berlin, Akademie-Verlag, Gmb. H., Berlin, W 1, 1965.

Engelbrecht H. — Über *Enterobius vermicularis*. Eine neue diagnostische Methode zum Eiernachweis fur Reihenuntersuchungen, *Dtsch. Gesundh. Wes*, 1965, *20*, H. 46. 2 074.

Engelbrecht H. — Eine leistungsfähige Methode zur Einreicherung von Helmintheneiern aus menschliches Fazes, *Dtsch. Gesundh. Wes.*, 1966, *21*, H 44, 2 100.

Faust E. C., Russel P. F. — Clinical parasitology, Ed. Kimpton (Henry), London, 1957.

Ferrioli F. Filho — Nova modificaçao do metodo do extracço de Loss-Baermann para pesquisa de larves do *Strongiloides stercoralis* nas fezes : Technica di pires, *Rev. Inst. Med., trop. Sao Paulo*, 1961, *3*, 1, 15.

Fülleborn F. — Neuere Methoden zum Nachweis von Helmintheneiern, *Arch. Schieff. u. Tropenhyg.*, 1920, 24, 174.

Fülleborn F. — Die Einreicherung der Helmintheneier mit Kochsalzlösung. *Dtsch. med. Wschr.*, 1920, *46*, 714.

Fülleborn F. — Zur „Hamburger Deckglas Auszählung", fur Helmintheneiern, *Arch. Schiffs-u. Tropenhyg.*, 1927, *31*, 5, 232.

Gherman I. — Dégénérescence des oeufs d'*Hymenolepis nana*, observée chez les personnes en voie de guérison spontanée, *Ann. Parasitol. Paris*, 1960, *35*, 5/6, 755.

Gherman I. — Dégénérescence spontanée des œufs d'*Hymenolepis nana*, forme de manifestation de l'immunité dans cette parasitose, *Ann. Parasitol. hum. comp.*, 1962, *37*, 4, 514.

Gherman I. —Coprologie clinică, Ed. medicală, Bucureşti, 1974

Goiffon R. — Manuel de Coprologie clinique, Ed. Masson et Cie Paris, 1925.

Golvan J. J., Drouhet E. — Techniques en parasitologie et mycologie, Ed. Flammarion et Cie, Paris, 1972.

Grandwohl's—Clinical laboratory methods and diagnosis, Frankel and Reitman editors, C. V. Mosby Comp., St. Louis, 1963.

Graham-Smith G. S. — Flies in relation to disease. Non-bloodsucking flies, Cambridge University Press, London, 1913.

Graham C. F.—A device for diagnosis of *Enterobius* infection, *Amer. J. trop. Med.*, 1941, 21, 159.

Hall M. C. — Studies on oxyuriasis. Types of anal swabes and scrapers with a description of an improved type of swab, *Amer. J. trop. Med.*, 1937, *17*, 3, 445.

Harada I., Mori O. — A simple method for the cultivation of hookworm larvae. *Igaku to Seibutsugaku*, 1951, *20*, 2, 65.

Ho Thi Sang, Brumpt L. C., Lapierre J. — Traitement de la strongiloidose par la ditiazanine en cure prolongée, *Bull. Soc. Path. exol.*, 1961, *54*, 5, 1 059.

Ho Thi Sang — Cours de coprologie parasitaire microscopique, Faculté de medecine de Paris, Laboratoire de parasitologie, 1966.

Hung S. L. — Über den Nachweis von Hakenwurmeiern in Kote, den Wert ihrer quantitativen Bestimmung und eine einfache neue Method für letzten, *Archiv. Schiffs-u. Tropenhyg.*, 1926, 30, 399.

Junod Ch. — Description d'une méthode polyvalente d'enrichissement parasitaire des selles convenant spécialement au diagnostic des helminthiases tropicales, *Bull. Soc. Path. exol.*, 1966, *59*, 1, 116.



Scanned with OKEN Scanner

JUNOD CH. — Comment interpréter l'examen parasitologique, bactériologique et mycologique des selles, Ed. Maloine, Paris, 1969.

JUNOD CH. — Technique coprologique nouvelle essentiellement destinée à la concentration de trophozoites d'amibes. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1972, *65*, 3, 390.

KALANTERIAN E. W. — Zur Kenntniss der Helminthen- fauna des Nor-Bajazetschen Bezirkes. *Archiv. Schiffs-u. Tropenhyg.*, 1927, *31*, 9, 438.

KALEDIN V. V. — Modificarea metodei de examinare prin raclarea pliurilor perianale. *Med. Parazit.* (*Mosk.*), 1971, *40*, 4, 496.

KALEDIN V. V. — Perfecționarea metodei de examinare pentru enterobioză prin discuri de celuloid. *Med. parazit.*, 1972, *41*, 2, 234.

KATZ NAFTALE, CHAIA GERALDO — Coprological diagnosis of schistosomiasis. I. Evaluation of quantitative techniques, *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 1968, *10*, 5, 295.

KATZ NAFTALE, CHAVES ADELÚ, PELLEGRINO J. — A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni, *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 1972, *14*, 6, 397.

KEAN B. H., MALLOCH C. L. — The neglected amoeba or entamoeba fragilis, *Amer. J. dig. Dis.*, 1966, *11*, 9, 735.

KOFOID C. A., BARBER M. A. — Rapid method for detection of ova of intestinal parasites in human stools, *J. Amer. med. Ass.*, 1918, 71, 1, 557.

KOHN J. — A one stage permanent staining method for faecal protozoa (în limba ebraică în *Dapim Refuiim*, 1960, 19, 160), referat în *Trop. Dis. Bull.*, 1961, 58, 148.

KOMIYA JOSHITAKA, KOBAYASHII AKIO — Evaluation of Kato's thick smear technique with a cellophane cover for helminth eggs in feces, *Jap. J. med. Sci. Biol.*, 1966, 19, 59.

KORTENHAUS F. — Verbesserte Nachweiss von Wurneiern in aufgehellten disken Troskenkotranstrich, *Munch. med. Wschr.*, 1928, 70, 1 029.

KUZNETZOV V. G. — Metoda simplă și efectivă a examinării materiilor fecale pentru ouă de helminți, *Med. parazit.*, 1964, 2, 108.

KREGER VAN RIJ N. J. W. — The genus *Criptococcus*, *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 1964, *44*, 4/5, 601.

LAMY L. — Diagnostic des parasitoses à protozoaires et helminthes au laboratoire, Ed. de la Tourelle, Saint Mandé (Seine).

LANGERON M., RONDEAU DU NOYER M. — Coprologie microscopique, Ed. Masson et Cie, Paris, 1926.

LANGERON M. — Précis de microscopie, ed. 1942 și 1949, Ed. Masson et. Cie, Paris.

LANGERON M., VANBREUGSECHEM R. — Précis de mycologie, Ed. Masson et Cie, Paris, 1952.

LARROUY G., CARRE G. — La recherche des œufs d'helminthes et des kystes de protozoaires en pratique courante de coprologie humaine par la méthode d'enrichissement de Ianeckso et Urbanyi, *Ann. Biol. clin.*, 1963, *21*, 10—12, 817.

LAVIER G. — Observations sur les Blastocystis, *Ann. Parasit. hum. comp.*, 1952, 27, 339.

LEE C. V. — Some observations en *Strongyloides stercoralis*, *Archiv. Schiffs-u. Tropenhyg.*, 1930, *34*, 5, 262.

LEVINA P. X. — Utilizarea soluției saturate de azotat de sodiu în metoda preparatelor-peliculă pentru helmintovoscopie în diagnosticarea ascaridiozei și tricocefalozei (în limba rusă), *Med. Parazit.*, 1970, 3, 379.

LEON N. — Quelques cas de myase observés en Roumanie et leur traitement par les paysans, *Arch. Parasit.*, 1898, *1*, 2, 314.

LEON N. — Note sur quelques vers parasites de Roumanie, *Annales scientifiques de l'Université de Jassy*, 1920, X, 3/4, 308.

LEON N., CIUREA I. — Un nouvel échinostome chez l'homme, *C. R. Soc. Biol.* (*Paris*), 1922, 87, 262.



Scanned with OKEN Scanner

LODDER J., KREGER VAN RIJ N. J. W. — The yeasts, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1952.
LODDER J. — The yeasts, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London, 1970.
LUPASCO G., SPÂNU I., SORESCU ANGELA, PANAITESCO D., HACIG ALICE, SOLOMON PAULA — Notes préliminaires sur la présence d'*Entamoeba dysenteriae* en Roumanie, *Arch. roum. Path. exp.*, 1959, *18*, 2, 216.
MACDONALD ETTA, WEGNER M. J. — A slide culture technique for the identification of *Candida albicans*, *Tex. Rep. Biol. Med.*, 1962, *20*, 1, 128.
MANDOUL R., DEMARTIAL L., PESTRE M., MOULINIER C. — La distomatose hépato-biliaire à petite douve, *J. Méd. Bordeaux*, 1966, *143*, 5, 685.
MANET L., SAVEL J. — Techniques usuelles de biologie clinique, Parasitologie, Ed. Flammarion et Cie, Paris, 1971.
MANOILESCU C. C. — Contribuţii la studiul comparativ al metodelor de analize coprologice pentru paraziţi intestinali, Teză de doctorat, Facultatea medicină Iaşi, 1937.
MARCELOIU-KINTI H., VERNOUS M. — Méthode simple pour l'étude du pouvoir fermentatif des *Candida*, *Arch. Inst. Pasteur*, hellén, 1961, *7*, 2, 163.
MARKELL E. K., VOGE MARIETTA — Diagnostic medical parasitology, Saunders Company W. B., Philadelphia and London, 1959.
MARTIN LARRY K., BEAVER PAUL C. — Evaluation of kato thick smear technique for quantitative diagnosis of helminth infections, *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1968, *17*, 3, 382.
MARTINI E. — Lehrbuch der medizinischen Entomologie, 4-e Aufl. Gustav Fischer, Jena, 1952.
MÉGNIN P. — Les acariens parasites, Ed. Gauthier-Vilars et Masson et Cie, Paris.
MIYAGAWA JONIY — Beziehungen zwischen Schistosomiasis japonica und der Dermatitis unter Berücksichtigung der Methode der Auffindung von Parasiteneiern in den Faeces und Beitrage zur Kentniss der Schistosoma Infektion, *Zbl. Bakt. Parasit.*, 1915, 69, 132.
MOORE DONALD V., CONNEL FRANK H. — Additional records of *Dipylidium caninum* infections in children in the United States with observations on treatment, *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1960, *9*, 6, 604.
MORENZ J. — Taxonimische Untersuchungen zur Gattung, *Geotrichum Link*, Johan Ambrosisus Barth, Leipzig, 1964.
NEUMANN L. G. — Parasites et maladies parasitaires du chien et du chat, Addelin et Houzeau, Paris, 1914.
NEVEU-LEMAIRE M.— Traité d'Helminthologie médicale et vétérinaire, Ed. Vigot Frères, Paris, 1936.
NEVEU LEMAIRE M. — Traité d'Entomologie médicale et vétérinaire, Ed. Vigot Frères, Paris, 1938.
NICKERSON W. J. — Reduction of inorganic substances by yeasts. Extracelular reduction of sulfite by species of *Candida*, *J. infect. Dis.*, 1953, *93*, 1, 43.
NICULESCU AL., LUNGU TR. — Îndreptar practic de parazitologie, Ed. agrosilvică, Bucureşti, 1968.
NITZULESCU V., MANOILESCU G., POPOVICI R. — Sur la recherche des oeufs d'helminthes par la méthode de Willis-Hung, *Bull. Acad. Méd. Roum.*, 1939, *7*, 2, 1.
NITZULESCU VIRGIL, POPESCU JEAN — Sur la modification de la méthode N.I.H. pour la recherche des oeufs d'oxyures, *Bull. Acad. Roum.*, 1940, *30*, 7, 440.
NITZULESCU VIRGIL, BELCHIŢĂ AURELIAN, CRĂCIUN OLGA — Două cazuri de *Hymenolepis diminuta* la om, *Bul. ştiinţ.* secţia ştiinţe medicale Acad R.P.R., 1951, 3. 857.
NITZULESCU VIRGIL — Elemente de Parazitologie, Ed. I.M.F., Bucureşti, 1955.
NITZULESCU VIRGIL, ŢINŢĂREANU JUSTINA — Asupra a 7 cazuri noi de izosporă. Rev. med. Tîrgu-Mureş, 1961, 3, 272.



Scanned with OKEN Scanner

NITZULESCU VIRGIL, DILIMON ANGELA, BRÂNZEI AMELIA, GHELBER ADRIANA — Asupra unui caz de dipilidoză la un copil de 8 luni, *Pediatria* (*Buc.*), 1964, *13*, 1, 61.
NITZULESCU VIRGIL, CORIJESCU VERONICA — Asupra valorii metodei Kato, *Pediatria* (*Buc.*), 1968, *17*, 5, 463.
NITZULESCU VIRGIL, CORIJESCU VERONICA — Date asupra condițiilor de apariție a cristalelor Charcot-Leyden în analizele coproparazitologice difazice, *Pediatria* (*Buc.*), 1970, 19, 3, 283.
O.M.S. — Conférence africaine C.C.T.A. sur l'ankylostomiase, Rapport 255/1963, annexe 3.
O.M.S. — Helminthes transmis par le sol, Rapport technique 277/1964.
O.M.S. — Lutte contre l'ascaridiose, Rapport technique 379/1967.
O.M.S. — L'amibiase, Rapport technique 421/1969.
PĂUN R. — Parazitozele intestinale, în volumul II al Tratatului de Medicină internă, Ed. Medicală, București, 1956.
PAVLOVSKI E. N. — Manual de parazitologie umană, Moscova, Leningrad, 1946.
PHILLIPSON R. F. — Flottation technique for Opistorchis and Clonorchis eggs, *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1962, 56, 3, 174.
PLOTNIKOV N. N. — Opisторchoza, Moscova, 1953.
PREDTECENSKI V. E., BOROVSKAIA V. M., MONGOLINA L. T. — Metode de laborator clinic, Ed. de Stat pentru literatura științifică, 1953.
QUILICI M. — Modification de la technique des zimogrammes en milieu gélosé, en vue du diagnostic rapide des *Candida*. *Ann. Parasit. hum. comp.*, 1968, *43*, 4, 525.
RAPER KENNETH B., THOM CH. and FENNEL J. DOROTHY — A manual of the Penicilina, Baillière, Taindall, Cox Ltd, London, 1949.
RAYNAUD J. P. — Étude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le contrôle des infestations parasitaires des bovines, ovines, équines et porcines, *Ann. Parasit. hum. comp.*, 1970, *45*, 3, 321.
REICHENOV E. — Über Dermflagellatenzüchtung und deren Anwendung zum Nachweis der Flagellaten im Stuhl, *Arch. Schiffs Tropenhyg.*, 1923, 27, 367.
REICHENOV E., VOGEL H., WEYER F. — Leitfaden für Untersuchung der tierischen Parasiten des Menschen, Johann Ambrosius Barth, Leipzig, 1969.
RIDLEY D. S., HOWGOOD B. C. — The value of formol-ether concentration of faecal cysts and ova, *J. Clin. Path.*, 1956, *9*, 74.
RITCHIE L. S., PAN C., HUNTER S. W. — A comparison of the zinc sulfate and the M G L (formaline-ether) technique, *J. Parasit.*, 1952, *38*, supp. to no. 4, 16.
RITCHIE L. S., LIN S., MOON A. P., FRICK L. P., WILLIAMS I. E., ASAKURA S., HISHINUMA Y. — The possible effects of pH and specific gravity on the ether sedimentation procedure in concentrating eggs and cysts, *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1960, *9*, 4, 444.
ROMAN E. — Modification du procédé de Telemann pour la concentration des éléments parasitaires dans les selles riches en débris cellulosiques, *Bull. Ass. Dipl. Microbiol. Nancy*, 1957, 68, 15.
ROMAN E. — À propos du diagnostic direct du téniasis à *Taenia* inerme. *Lyon. méd.*, 1961, *205*, 23, 1327.
SASA MANABU, HAYASCHI SHIGEO, TANAKA HIROSHI, SHIRASAKA RYUKO — Application of test tube cultivation method on the survey of hookworms and related human nematodes infection, *Jap. J. exp. Med.*, 1958, *28*, 3, 129.
SCHMORL G. — Die pathologisch-histologischen Untersuchungs Methoden, Leipzig, 1921.
SCHÜFENER Q., SWELLENGREBEL N. H. — Eine zweizeitige Methode zum Nachweis von oxyuris Eiern. Ihre Leistung gegenüber dem americanischen N. I. H. Wischer, *Zbl. Bakt., Abt. I Orig.*, 1943—1944, 151, 71 și 114.
SKRIABIN K. I. — Evoluția helmintologiei sovietice, Ed. Acad. Științe U.R.S.S., Moscova-Leningrad.
SEGRETAIN G., DROUHET E., MARIAT F. — Diagnostic de laboratoire en mycologie médicale, Ed. de la Tourelle, *Saint Mandé* (*Seine*), 1958.



Scanned with OKEN Scanner

SEGRETAIN G., DROUHET E., MARIAT F. — Les mycoses et les champignons pathogènes (dans Traité de biologie appliquée Diagnostics microbiolgiques), Paris, Ed. Maloine, 1963.

SERBINOW P. I., SCHULMANN (HARKOV) — Über die Methode der Analabschabung zur Oxyurisdiagnose. *Arch. Schiffs Tropenhyg.*, 1927, 31, 10, 482.

SILARD ROZALIA — Conservarea şi colorarea frotiurilor coprologice prin metoda polivinil-alcool-tricrom, *Microbiologia* (*Buc.*), 1963, 3, 259.

SIMONOVICI E. N., TIAPKINA N. P. — O modificare manuală a metodei Fölleborn (în limba rusă), *Med. Parazit.* (*Mosk.*), 1961, *30*, 6, 677.

SOMMER F. — Über den Ban und die Entwicklung der Geschlechtsorgane von *Tenia* mediocanelata und *Tenia solium*, Wilhelm Engelmann, Leipzig, 1874.

STOLL N. R. — An effective method of counting hookworn eggs in feces, *Amer. J. Hyg.*, 1923, 3, 59.

STOLL N. R., HAUSHEER W. C. — Accuracy in the dilution egg counting method, *Amer J. Hyg.*, 1926, 6, 80.

STOLL N. R., HAUSHEER W. C. — Concerning two options in dilution egg counting : small drop and displecement, *Amer. J. Hyg.*, 1926, march supplement, 6, 134.

TASCHDJIAN CLAIRE L., BOURCHELL JAMES J., KOZIM PHILIP J. — Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum-substances, *Amer. J. Dis. Child.*, 1960, *99*, 22, 212.

TCHOTCHES R. — Vergleichende Untersuchungen über den Nachweis von Darmprotozoen beim Menschen unter Anwendung der MIFC Anreicherungsmethode, *Z. Tropenmed. Parasit.*, 1967, *18*, 4, 475.

TELEMANN W. — Eine Methode zur Erleichterung der Auffindung von Parasiteneiern in den Faeces, *Dtsch. med. Wschr.*, 1908, 34, 1 510.

TOMA L. — Contribuţii la studiul epidemiologiei strongiloidozei într-o zonă din nordul Transilvaniei, Teză de doctorat în medicină, 1972.

TRIOZON F. — Diagnostic de la distomatose hépatique humaine par la recherche des oeufs dans les selles, *Ann. Inst. Pasteur Lille.*, 1957, 9, 105.

TURNER J. A. — Diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection by rectal scraping. A comparison with rectal biopsy and fecal examination, *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1962, *11*, 5, 620.

VANNI VITTORIO — Terapia clinica delle malattie da zoo parassiti dell'uomo, Roma, 1944.

VIDYARTHI SUBASH C. — Merthiolate iodine formalin concentration for stool studies, *Amer. J. clin. Path.*, 1967, *48*, 6, 605.

VUILLEMIN PAUL — Les champignons parasites, Ed. Paul Lechevalier, Paris, 1931.

VOMBREUSEGHEM R. — Guide pratique de mycologie médicale et vétérinaire, Ed. Masson, et Cie, Paris, 1966.

WASOWA D. — Replacement of the Hall's method by a method of cellophane sticking plaster for the laboratory diagnosis of enterobiosis, *Wiadornosci Parazytol.*, 1963, 9, 233.

WENYON C. M. — Protozoology, Ed. Baillière, Tindall, Cox Ltd. London, 1926.

WEIL G., LUTZ A., WITZBERGER M . A. — Utilisation en pratique courante d'un milieu de Nickerson dans le diagnostic des candidoses génitales, *Bull. Féd. Soc. Gynéc. Obstét. franç.*, 1959, 5, 544.

ZAMAN V., CHEONG C. H. — A comparison of Kato thick smear technique with zinc sulfate flotation, *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1967, 61, 755.

ZIERDT CH. H., RUDE S. WILLADENE, BULL BRIAN S. — Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*, *Amer. J. clin. Path.*, 1967, 48, 5, 495.

ZOTTA G. — Indicaţiuni utile privitoare la analizele parazitologice ale materiilor fecale, *Rev. ştiinţ. med.*, 1938, *27*, 2, 130.

ZSCHUCKE JOHANNES — Eine kammer für die mikroskopische Zählung von Helmintheneiern und Larven, *Archt. Schiffs Tropenhyg.*, 1931, *35*, 6, 357

Redactor de carte : Dr. ALGEORGE GEORGE
Tehnoredactor : ELEINA AFILIPOAIE

Bun de tipar : 26.III.1976. Formatul : 16/61×86 Hirtie : Scris 1 A 61×86/3672 cu 80% grad alb. Coli de tipar : 14,75 Tiraj : 3250+70 S. P.

c. 2550. I. P. INFORMAȚIA
str. Brezoianu nr. 23—25
București

Scanned with OKEN Scanner

EDITURA MEDICALA

vă recomandă :

M. BALŞ

Terapia infecţiei, ed. a II-a

I. GAVRILĂ, C. PĂSCARIU

Septicemiile

P. SIMICI

Elemente de chirurgie intestinală

L. BULIGESCU

Hepatitele cronice

AL. COLŢOIU

Sindroame de urgenţă în dermato-venerologie

Scanned with OKEN Scanner